

**Einflüsse einer kombinierten Läsion des
somatosensorischen Kortex und des peripheren
Nervus facialis auf die strukturelle
Gehirnplastizität und die funktionelle Erholung
der Vibrissenmuskulatur bei der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität

von Judit Kiesler

geboren am 17.04.1988 in Leipzig

Gutachter

1. Prof. Dr. Orlando Guntinas-Lichius, Jena
2. Prof. Dr. Hubertus Axer, Jena
3. Prof. Dr. Doychin Angelov, Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.10.2014

Für meine Mutter, die mir die Ausbildung ermöglicht
und mich stets unterstützt hat.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
B	Breite
bzw.	beziehungsweise
ChAT ⁺	choline acetyltransferase
Dr.	Doktor
dt.	deutsch
et al.	et alia (und andere)
etc.	et cetera
FFA	Fazialis-Fazialis-Nervenanastomose
GABA	Gamma-aminobutyric acid (γ-Aminobuttersäure)
H	Höhe
li.	links
M	Mol
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid (dt.: Boten-Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
N	absolute Anzahl
o.g.	oben genannt
OT	Objektträger
PBS	phosphate-buffered saline (dt.: phosphatgepufferte Salzlösung)
PNS	peripheres Nervensystem
PT	Photothrombose
R	Ramus
re.	rechts
s.	siehe
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des arithmetischen Mittels)
T	Tiefe

u.a.	und andere
usw.	und so weiter
VGAT ⁺	vesicular GABA transporter (zu dt.: vesikulärer GABA-Transporter)
VGLUT2 ⁺	vesicular Glutamate transporter (zu dt.: vesikulärer Glutamat-Transporter)
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent
°C	Grad Celsius

Inhaltverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
2.1 Nervus facialis – Aufbau und Funktion	7
2.1.1 Zentrale Lage und Verschaltung	7
2.1.2 Peripherer Verlauf	8
2.2 Parese des Nervus facialis	10
2.3 Läsion peripherer Nerven	11
2.3.1 Klassifikation peripherer Nervenläsionen	11
2.3.2 Degeneration peripherer Nerven	13
2.3.3 Regeneration peripherer Nerven	14
2.3.4 Ursachen und Ausmaß für eine Defektheilung	15
2.4 Der Nervus facialis im Tiermodell	17
2.5 Veränderungen im Fazialiskerngebiet nach alleiniger Fazialisläsion	18
3. Ziele der Arbeit	20
4. Materialien und Methoden	22
4.1 Tiere	22
4.2 Operatives Vorgehen	22
4.2.1 Fazialis-Fazialis-Nervennaht rechts	23
4.2.2 Photothrombose	24
4.3 Videoaufnahmen und digitale Bildanalyse	25
4.4 Histologische Untersuchungen des Fazialiskerngebiets	27
4.4.1 Gewebefixierung und Schnitttechnik	27
4.4.2 Antikörper	29
4.4.3 Immunhistochemie	30
4.5 Histologische Auswertung	31
4.5.1 Stereologische Analyse	31
4.5.2 Volumenschätzung nach dem Cavalieri-Prinzip	34
4.6 Fotodokumentation	35
4.7 Statistik	36
5. Ergebnisse	37

5.1	Volumen	37
5.2	Anzahl und Dichte inhibitorischer (VGAT ⁺) Synapsen	39
5.3	Anzahl und Dichte exzitatorischer (VGLUT2 ⁺) Synapsen	41
5.4	Verhältnis exzitatorischer zu inhibitorischen Synapsen	43
5.5	Motoneuronen und cholinerge Synapsen (ChAT ⁺)	45
5.6	Funktionsanalyse des Nervus facialis	49
5.7	Korrelationsanalyse	50
6.	Diskussion	53
6.1	Funktionsdefizit nach Photothrombose und Farbstoffinjektion	54
6.2	Atrophie des Nucleus n. facialis	55
6.3	Deafferenzierung des Nucleus n. facialis	56
6.4	Verlust und Atrophie von Motoneuronen	58
6.5	Schlussfolgerungen	60
7.	Literatur- und Quellenverzeichnis	62
8.	Abbildungsverzeichnis	68
9.	Danksagung	69
10.	Tabellarischer Lebenslauf	70
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	72

1. Zusammenfassung

Eine Läsion des Nervus facialis mit Defektheilung geht für die Betroffenen mit einer bleibenden Funktionsstörung und häufig mit einer Verminderung der Lebensqualität und einer Stigmatisierung einher. Die Mechanismen, die nach der Verletzung des Nervus facialis zur Defektheilung und unzureichenden funktionellen Erholung führen, sind noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Hierbei erhofft man sich ein besseres Verständnis der mangelhaften Regeneration nach Läsion, um daraus Konzepte zur Verbesserung der Nervenfunktion abzuleiten.

Das hier angewandte Fazialis-Modell bei der Ratte bietet dabei eine optimale Möglichkeit, um den Zusammenhang zwischen peripherer Läsion, den zentralen Auswirkungen auf das Fazialiskerngebiet und die funktionelle Erholung zu untersuchen. Es wurde geprüft, wie sich die zusätzliche Läsion des supranukleär gelegenen Barrel-Kortex mit Hilfe der etablierten Methodik der Photothrombose auf die periphere Regeneration und die funktionelle Erholung auswirkt. Das Fazialiskerngebiet wurde diesbezüglich auf seine Größe, Anzahl und Dichte synaptischer Verbindungen sowie der Motoneuronenanzahl und –morphologie analysiert. Zudem wurde die motorische Beeinträchtigung nach Fazialis-Fazialis-Nervennaht (FFA) mit oder ohne Photothrombose des Barrel-Kortex mit Hilfe der videobasierten Bewegungsanalyse der Vibrissen ermittelt.

Für die Versuchsreihe wurde 16 männliche Wistar-Ratten genutzt, die in zwei Tiergruppen eingeteilt wurden. Die erste Gruppe (Photothrombose-Tiere, PT) erhielt nach der rechtseitigen Durchtrennung des N. facialis mit nachfolgender FFA eine beidseitige Photothrombose des Barrel-Kortex der in der sensorischen Hirnrinde liegt. Eine Infarzierung dieses Hirnareals wurde durch die Belichtung des Barrel-Kortex mit einer Kaltlichtquelle nach intravenöser Injektion des photoreagiblen Farbstoffes Bengalrosa. An der zweiten Gruppe (Kontrolltiere, Sham) wurde ebenso eine FFA vorgenommen, jedoch wurde lediglich der Farbstoff Bengalrosa in die Schwanzvene injiziert ohne eine Belichtung des Barrel-Kortex vorzunehmen.

Unerwarteterweise zeigten die Sham-Tiere eine deutlich schlechtere funktionelle Erholung als die Ratten, denen eine Photothrombose gesetzt wurde. Diese funktionellen Unterschiede korrelierten mit morphologischen Veränderungen. Die deutlich verminderten Kernvolumina und der reduzierte synaptische Input bei den Sham-Tieren gingen mit einer im Vergleich zu den PT-Tieren schlechteren Vibrissenbeweglichkeit einher. Dies und vor allem die verminderte Fazialismotoneuronenanzahl und –fläche auf der Läsionsseite der Kontrollgruppe lassen auf einen neurotoxischen Effekt des Farbstoffes Bengalrosa schließen. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass es nach alleiniger FFA bei der Ratte nicht zu einer Abnahme der Nervenzellenanzahl und –größe im Fazialiskerngebiet kommt.

Zudem ist davon auszugehen, dass die Farbstoffeffekte auch bei den PT-Tieren auftraten. Denn hier kam es auf der im Kerngebiet der operierten Seite ebenso zu einer Reduktion der Motoneuronenanzahl, was wie bei den Sham-Ratten auf eine toxische Komponente von Bengalrosa hinweisen könnte. Trotzdem zeigte sich eine bessere Erholung der Amplitude der Vibrissenbewegung auf der operierten Seite. Dies deutet darauf hin, dass supranukleär gelegene Areale des ZNS die Regeneration der Fazialisneurone beeinflussen.

Hinweise auf Neurotoxizität von Bengalrosa zeigten sich in früheren Studien, die den Farbstoff verwendeten nicht. Mit den hier gezeigten Resultaten der Kontrollgruppe nach Bengalrosa-Injektion ist es jedoch empfehlenswert, das häufig für Hirnläsionen verwendete Modell der Photothrombose mit Bengalrosa neu zu überdenken.

2. Einleitung

2.1 Nervus facialis – Anatomie, Topographie und Funktion

Der Nervus facialis ist der siebte von zwölf Hirnnerven. Er besteht aus zwei Anteilen: dem eigentlichen Fazialisanteil, der speziell-viszeromotorischen Fasern führt, und dem Intermediusanteil, der allgemein-viszeromotorische (parasymphatische) und viszerosensible Bahnen enthält (Trepel, 2003).

2.1.1 Zentrale Lage und Verschaltung

Entsprechend der verschiedenen Qualitäten, die der N. facialis vereint, hat er seinen Ursprung in unterschiedlichen Kerngebieten.

Die parasymphatischen Fasern des Intermediusanteils zur Versorgung von Tränen-, Speichel- und Schleimdrüsen gehen aus dem Nucleus (Ncl.) salivatorius superior hervor.

Ein afferenter (viszerosensibler) Teil des N. facialis projiziert von den Geschmacksknospen der vorderen zwei Drittel der Zunge über den N. intermedius zum Ncl. tractus solitarii (Schünke et al., 2005).

Die viszeromotorischen Fasern haben ihren Ursprung im Ncl. facialis, der im Pons des Hirnstamms liegt. Willkürliche Bewegungen der mimischen Muskulatur werden jedoch nicht primär von den Motoneuronen des Fazialiskerngebietes generiert, sondern von supranukleär gelegenen Regionen. So erhält der Ncl. facialis Projektionen vom primären Motokortex über die kortikobulbären Bahnen (Jackler & Brackmann, 2004). Bedeutsam ist, dass ein Teil dieser Fasern in Höhe des kaudalen Pons nach kontralateral kreuzen, um zum dort gelegenen Kerngebiet zu ziehen. Hierbei wird der ventrale und superiore Teil des Kerngebiets (enthält die Motoneurone, die zur occipitofrontalen Muskulatur ziehen) von beiden Motokortices angesteuert, während der dorsale und inferior gelegene Bereich nur kontralaterale Projektionen erhält (Trepel, 2003). Dies führt zu einer klinisch relevanten Differenzierungsmöglichkeit zwischen zentraler (supranukleärer) und peripherer Fazialisläsion (Punkt 2.2). Denn während die occipitofrontale Muskulatur bei einer

einseitigen zentralen Läsion, aufgrund der bilateralen Versorgung mit kortikalen Fasern intakt bleibt, kommt es bei einer ipsilateralen peripheren Funktionsstörung auch hier zu Lähmungserscheinungen.

Direkte Projektionen erhält der Ncl. facialis auch von anderen Kerngebieten, die im Hirnstamm liegen. So zum Beispiel vom vestibulocochlearen oder vom Trigeminskern (Jackler & Brackmann, 2004). Gleichzeitig bestehen zwischen diesen Nuclei und dem Fazialiskerngebiet aber auch indirekte Verbindungen, die über den Neokortex verlaufen.

Nagetiere wie Ratten und Mäuse nehmen ihre Umwelt zu einem großen Teil über ihre Tasthaare (Vibrissen) im Gesicht wahr. Mit ihnen können sie die Oberfläche verschiedenster Gegenstände ertasten und differenzieren. Diese taktilen Informationen werden über sensible Afferenzen aus dem Bereich der Tasthaare über den N. trigeminus (V) zum im Hirnstamm gelegenen sensorischen Ncl. nervi trigemini geleitet (Feldmeyer et al., 2013). Das von hier ausgehende zweite Neuron kreuzt auf die kontralaterale Seite und projiziert über den Lemniscus medialis in den Thalamus, wo die Umschaltung auf das dritte Neuron erfolgt (Trepel, 2003). Dieses zieht weiter zum Barrel-Kortex. Der Barrel-Kortex ist ein Abschnitt der somatosensorischen Großhirnrinde. Die hier in der vierten Rindenschicht liegenden Neurone bilden Cluster, welche in ihrer Form an ein Fass erinnern (engl.: barrel) und sind namensgebend für diese Region (Woolsey, 2003). Hier kommen die taktilen Wahrnehmungen durch die Tasthaare in somatotoper Anordnung zum Bewusstsein (Woolsey & Van der Loos, 1970). Ausgehend vom Barrel-Kortex kommt es zu komplexen Verschaltungsmustern innerhalb der somatosensorischen Rindenschichten sowie zu anderen neokortikalen Arealen, wie z.B. dem Motokortex (Feldmeyer et al., 2013). Der Motokortex ist seinerseits über die kortikobulbären Bahnen wieder mit dem Fazialiskerngebiet verbunden.

2.1.2 Peripherer Verlauf

Bevor der motorische Anteil des N. facialis den Hirnstamm im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels verlässt, ziehen die Fasern zunächst nach dorsal um den Ncl. abducens, um dort das innere Fazialisknie (Genu n. facialis) zu formen. Nachdem der

motorische Anteil des N. facialis den Ncl. abducens umrundet und sich die Fasern des Intermediusanteil dem Verlauf angeschlossen haben, tritt der Nervus facialis als qualitativ gemischter Nerv im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels aus dem Hirnstamm aus (Schünke et al., 2005).

Der Intermediusanteil führt neben den parasympathischen Fasern, die die Tränendrüse sowie die Glandulae submandibularis und sublingualis innervieren, auch speziell-viszerosensiblen Bahnen. Diese ziehen als Chorda tympani weiter, die große Teile der Geschmacksknospen versorgt.

Nach kurzem intrakraniellen Verlauf tritt der siebte Hirnnerv über den Porus acusticus internus in das Felsenbein ein. Hier verläuft er im Canalis nervi facialis (Lippert, 2003). Bis zum Austritt aus dem Foramen stylomastoideum können drei Abschnitte unterschieden werden:

- 1) Labyrinthäres Segment: Abgabe des N. petrosus major (allgemein-viszeromotorisch) zur Tränen-, Nasen- und Gaumendrüssen (Jackler & Brackmann, 2004).
- 2) Tympanales Segment: Abgabe des N. stapedius zum M. stapdius (Berghaus et al., 1996), wichtig für die Schalldämpfung im Mittelohr(Lippert, 2003)
- 3) Mastoidale Segment: Abgabe der Chorda tympani (parasympathisch) zu den Glandulae submaxillaris et sublingualis sowie zu Geschmacksknospen der vorderen zwei Drittel der Zunge ab (Eberle, 2011)

Nach dem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum tritt der N. facialis in die Parotisloge ein, um sich dann in seine motorischen Endäste aufzuzweigen, die zur mimischen Muskulatur ziehen (Schünke et al., 2005). Hierbei handelt es sich um:

- Rr. temporales
- Rr. zygomatici
- Rr. buccales
- R. marginalis mandibulae
- R. colli

Der siebte Hirnnerv leistet somit einen wichtigen Beitrag zur verbalen und zur nonverbalen Kommunikation. Ein Ausfall dieser Funktion geht für viele Patienten mit einer Minderung der Lebensqualität und einer Stigmatisierung einher (Guntinas-Lichius, 2007).

2.2 Parese des Nervus facialis

Eine Läsion des Nervus facialis, die zu einer verminderten Bewegung der mimischen Muskulatur führt, wird klinisch als Fazialisparese bezeichnet.

Nach dem Ort der Läsion ist die zentrale von der peripheren Fazialisparese zu unterscheiden. Bei der zentralen Läsion kommt es zu einer Schädigung von supranukleär gelegenen Strukturen (Tractus corticonuclearis, Kortex) (Guntinas-Lichius & Sittel, 2004; Lippert, 2003). Es resultiert eine Parese der mimischen Muskulatur auf der kontralateralen Seite unter Aussparung der occipitofrontalen Muskeln. Stirnrunzeln und Augenschluss sind demzufolge bei einem streng unilateralen zentralen Funktionsausfall immer noch möglich. Die häufigsten Ursachen für eine zentrale Fazialisparese sind Schlaganfälle und Hirntumoren (Berghaus et al., 1996). Die Therapie richtet sich nach der Grunderkrankung.

Im Gegensatz dazu kommt es bei einer peripheren Parese zu einer Schädigung auf Höhe des Kerngebietes oder im Verlauf der vom Ncl. facialis ausgehenden Axone (Finkensieper et al., 2012). Bei dieser Form der Läsion kommt es einem ipsilateralen Ausfall der mimischen Muskulatur. Abhängig von der Lokalisation der Schädigung können bei der peripheren Form zusätzlich eine Hyperakusis, Schmeckeinschränkungen sowie Störungen der Tränen- und Speichelsekretion auf der gleichen Seite resultieren (Guntinas-Lichius, 2007; Masuhr & Neumann, 2005). Ätiologisch kommt bei der peripheren Fazialisparese eine Vielzahl von Ursachen in Frage. Am häufigsten ist die idiopathische Fazialisparese (IFP, Bellsche Lähmung) (Volk et al., 2010), die ca. 60 bis 80% der peripheren Läsionen ausmacht (Berghaus et al., 1996; Mumenthaler & Mattle, 2002). Hierbei handelt es sich nach Abklärung anderer Ursachen immer noch um eine Ausschlussdiagnose (Grosheva et al., 2010). Weitere häufige Ursachen sind neben der idiopathischen Parese folgende:

- entzündlich (durch Varizella-zoster-Virus, Herpes-simplex-Virus, Borreliose, Otitis media u.a.)
- neoplastisch (z.B. durch Parotistumore, Vestibularisschwannome o.a. Neoplasien im Nervverlauf, die zu einer Kompression führen könnten)
- traumatisch

Eine periphere Parese aufgrund eines Traumas kann z.B. nach einer Felsenbeinfraktur, Gesichtsverletzung oder iatrogen (z.B. durch Entfernung eines Parotistumors) bedingt sein (Finkensieper et al., 2012). Trotz der Verwendung zügiger und aufwendiger chirurgischer Rekonstruktionsverfahren bleibt das funktionelle Ergebnis langfristig gesehen unbefriedigend (Guntinas-Lichius, 2007; Irintchev et al., 2010) . So können auch Jahre nach dem Trauma verschiedene Zeichen der Defektheilung auftreten, wie z.B. Synkinesien oder Krokodilstränen (Guntinas-Lichius & Sittel, 2004)(Punkt 2.3.4).

Die Inzidenz der peripheren Fazialisparese liegt bei ca. 25 – 30/100.000 Einwohnern (Guntinas-Lichius & Sittel, 2004). Aufgrund seines langen intrakraniellen und des oberflächlich extrakraniellen Verlaufs ist der N. facialis auch der Hirnnerv, der am häufigsten von einem Trauma mit betroffen ist (Moran & Graeber, 2004). Die Inzidenz der zentralen Fazialisparese ist nicht bekannt (Finkensieper et al., 2012).

Neben den o.g. erworbenen Formen einer Fazialisparese gibt es auch die angeborenen Läsionen, die häufig durch ein Geburtstrauma (Zangengeburt) oder ein genetisches Syndrom (z.B. Melkersson-Rosenthal-Syndrom, Möbius-Syndrom u.a.) bedingt sind (Guntinas-Lichius & Sittel, 2004).

Unabhängig davon, um welche Art von Funktionsausfall es sich handelt, geht diese für die meisten Patienten aufgrund der eingeschränkten verbalen und nonverbalen Kommunikationsfähigkeit mit einer Minderung der Lebensqualität einher (Guntinas-Lichius, Straesser, et al., 2007).

2.3 Läsion peripherer Nerven

2.3.1 Klassifikation peripherer Nervenläsionen

Die Schädigung eines peripheren Nervs kann unterschiedlichen Ausmaßes sein. Im Wesentlichen kann man nach Seddon (1942) drei Formen kategorisieren:

- Neurapraxie: reversibler Ausfall der Nervenfunktion, z.B. durch Druckläsion. Die Kontinuität des Axons sowie des Nervenhüllgewebes (Myelinscheide, Peri- und Epineurium) bleibt erhalten und damit auch die elektrische Leitfähigkeit.
- Axonotmesis: Durchtrennung des Axons bei erhaltenem Nervenhüllgewebe
- Neurotmesis: Durchtrennung des gesamten Nervs (Axon und Nervenhüllgewebe)

Erweitert wurde diese Klassifikation durch Sunderland, der je nach Schwere der Läsion fünf Kategorien unterscheidet (Grad 1 – 5)(Sunderland, 1951). Hierbei entsprechen Grad 1 und 2 der Neurapraxie bzw. Axonotmesis nach Seddon. Die Neurotmesis unterteilt Sunderland in drei Schweregrade je nach Beteiligung der umgebenden Hüllstruktur an der Kontinuitätsunterbrechung:

- Grad 3: Beteiligung des Endoneuriums
- Grad 4: Beteiligung des Perineuriums
- Grad 5: Beteiligung der Epineuriums.

Diese Unterteilung trägt zur genaueren Abschätzung nach einer Läsion peripherer Nerven bei (Sunderland, 1990).

Im Falle der Axonotmesis und Neurotmesis kommt es, im Gegensatz zur Neurapraxie, zu einer degenerativen Läsion. Diese Einteilung der Nervenläsion ist für die Prognoseabschätzung äußerst relevant. Die degenerativen Formen der Nervenschädigung gehen demzufolge regelhaft mit einer Defektheilung einher, während bei der nicht-degenerativen Neurapraxie von einem Erhalt der Nervenkontinuität und somit mit einer guten Erholung der Funktion zu rechnen ist (Finkensieper et al., 2012).

In der hier vorliegenden Studie wurde an den Versuchstieren eine FFA nach vorheriger Durchtrennung des Nervs vorgenommen (Einzelheiten zum operativen Verfahren s. Punkt 4.2.1). Es wurde somit der Zustand einer Neurotmesis nach Seddon (bzw. Grad 5 –Verletzung nach Sunderland) simuliert.

Nach eingetretener Schädigung des Nervs laufen sowohl im proximalen als auch im distalen Nervenstumpf Degenerations- und Regenerationsprozesse ab, die folgend näher erläutert werden.

2.3.2 Degeneration peripherer Nerven

Nach der Schädigung eines peripheren Nervs in Form einer Durchtrennung liegen am Ort der Läsion ein proximaler und ein distaler Stumpf vor. In Folge der Läsion kommt es zu verschiedenen Umbauvorgängen des Axons und der umhüllenden Myelinscheide betreffend.

Am distalen Stumpf des lädierten Nervs spielt sich zunächst die Wallersche oder absteigende Degeneration ab. Dieser Prozess ist durch den Abbau des Axons (Axolyse) und den Zerfall der umgebenden Myelinscheide (Myelinolyse) gekennzeichnet (Chen et al., 2007; Trepel, 2003) und wurde zuerst durch August Waller 1850 beschrieben (Fenrich & Gordon, 2004).

Die Degeneration des Nervs beginnt innerhalb von 24 Stunden nach erfolgter Läsion (Navarro et al., 2007) und führt zum Zusammenbruch des axonalen Zytoskeletts und der Auflösung des Axolemmas und Axoplasmas (Fenrich & Gordon, 2004; Hall, 2005; Raivich & Makwana, 2007).

Der Verlust des axonalen Kontakts ist für die umgebenden Schwannzellen das Signal, sich zu dedifferenzieren und zu proliferieren (Navarro et al., 2007). Diese phagozytieren einerseits die entstehenden Axon- und Myelinschollen, gleichzeitig produzieren die Schwannzellen auch Zytokine, die eine inflammatorische Reaktion am Ort der Nervschädigung bedingen (Choi & Dunn, 2001).

Die Phagozytose von Axon- und Myelinschollen ist nicht nur Ausdruck einer effektiven Gewebereinigung, sondern auch ein wichtiger Beitrag in Vorbereitung auf die Regeneration des Nervs. Denn die Entfernung der Myelintrümmer hat den positiven Nebeneffekt, dass auch Proteine, die normalerweise das axonale Wachstum hemmen wie z.B. das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), beseitigt werden (Fenrich & Gordon, 2004).

Die axonale Degeneration findet nicht ausschließlich am distalen Stumpf statt. Auch das proximale Nervenende wird teilweise abgebaut. Das erfolgt grundsätzlich wie am distalen Axon, jedoch hier nur bis zum ersten Ranvierschen Knoten von der Läsionsseite aus

betrachtet (Fenrich & Gordon, 2004; Sahni et al., 2005). Davon ausgehend findet im weiteren Verlauf die Regeneration des beschädigten Nervs statt.

2.3.3 Regeneration peripherer Nerven

Im Gegensatz zum ZNS sind Nerven des PNS zur Regeneration nach Läsion befähigt. Diese geht vom proximalen Nervenstumpf aus (Hall, 2005).

Die Zellkörper der verletzten Neurone durchlaufen verschiedene Veränderungen. So kommt es zur so genannten „Chromatolyse“ des Perikaryons, die sich durch eine Auflösung der schollenförmigen Anordnung des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER, auch Nissl-Schollen genannt) und einer Verdrängung des Nukleus an den Zellrand auszeichnet (Fu & Gordon, 1997). Diese morphologischen Veränderungen gehen mit einer erhöhten mRNA- und damit auch Proteinsynthese einher und sind Ausdruck einer Anpassung des Neurons auf molekularer Ebene (Raivich & Makwana, 2007). Die Produktion von Neurotransmittern wird zugunsten von Wachstumsfaktoren herunterreguliert (Fawcett & Keynes, 1990; Guntinas-Lichius & Angelov, 2008). Es wechselt somit von einem Transmitter-orientierten in einen Wachstumsmodus (Fu & Gordon, 1997; Moran & Graeber, 2004).

Durch den anhaltenden Transport von Zellorganellen und Proteinen vom Zellkörper aus in die Peripherie kommt es zum Anschwellen des proximalen Stumpfs – es bildet sich ein Wachstumskegel aus. Gleichzeitig ordnen sich die proliferierenden Schwannzellen in Längsrichtung an und formen die Hanken-Büngner-Bänder (Guntinas-Lichius & Angelov, 2008). Entlang dieser Leitschiene aus Schwannzellen kann sich dieser Wachstumskegel nach distal ausdehnen (Choi & Dunn, 2001). Jedoch wachsen die lädierten Axone nicht geordnet in die Peripherie, sondern es bilden sich pro Axon zahlreiche Tocheraxone aus. Dieses an der Läsionsstelle auftretende Phänomen ist auch als kollaterales Sprouting bekannt. Ein Teil dieser massiv aussprossenden Axone degenerieren wieder (Fawcett & Keynes, 1990). Die verbleibenden Axone, die die ursprüngliche Anzahl bei Weitem übersteigen, wachsen weiter in die Peripherie vor (Guntinas-Lichius & Angelov, 2008). Die durchschnittliche

Wachstumsgeschwindigkeit eines regenerierenden Axons beträgt ca. 1 – 2 mm/Tag (Choi & Dunn, 2001).

Zusätzlich zum kollateralen Sprouting am Läsionsort kommt es beim Erreichen der Endplatten durch die Axone zu weiteren Aufzweigungen – das terminale Sprouting tritt auf (Angelov et al., 2007).

Entsprechend dieser enormen Aussprossung der Axone am Ort der Läsion und an den motorischen Endplatten, wird eine Muskelfaser nach einer Verletzung zumeist von mehreren Motoneuronen innerviert. Diese polyneuronalen Innervation trägt zur Defektheilung bei, die durch funktionelle Defizite unterschiedlichen Ausmaßes gekennzeichnet ist (Guntinas-Lichius, 2007).

2.3.4 Ursachen und Ausmaß für eine Defektheilung

Eine Defektheilung tritt prinzipiell nur dann auf, wenn es zu einer Regeneration des lädierten Nervs gekommen ist (Guntinas-Lichius, 2007) und kann selbst dann unterschiedliche Ausmaße annehmen und vielgestaltig sein.

Eine mögliche Ursache der Defektheilung kann im Bereich der Motoneurone liegen. Hier kommt es zum synaptischen Stripping, einem Phänomen, das erstmals durch Blinzinger und Kreutzberg (1968) beschrieben wurde. Die afferenten Synapsen setzen sowohl an den Dendriten als auch direkt am Soma der Fazialisneurone an. In Folge des synaptischen Stripping verlieren eine Vielzahl von synaptischen Endigungen den Kontakt zum Motoneuron in den ersten Wochen nach der Axotomie (Moran & Graeber, 2004; Navarro et al., 2007). Dies betrifft vor allem die inhibitorischen Synapsen, die vorwiegend am Soma eines Motoneurons ansetzen. Dies wird auch als Grund angesehen, dass es seitens der Motoneurone zur Hyperexzitabilität kommt. Dadurch sind feinmotorische Bewegungen nur eingeschränkt möglich (Moran & Graeber, 2004).

Regulär steuert bei einem nicht-verletzten Nerv jedes Motoneuron nur eine Endplatte einer Muskelfaser an. Das ist nach einer Durchtrennung sowie erfolgter Regeneration nicht mehr der Fall. Bei einer Verletzung mit Kontinuitätsunterbrechung des Nervs wachsen einerseits

multiple Tochteraxone ungeordnet am Läsionsort aus (kollaterales Sprouting). Die entstehenden Tochteraxone übersteigen von der Anzahl her die ursprünglich vorhandenen Axone bei Weitem (Angelov et al., 2007). Andererseits kommt es zu einer erneuten Aufteilung der aussprossenden Axone bei Erreichen einer Muskelfaser (terminales Sprouting). Das kollaterale und terminale Sprouting bedingt, dass die Muskelfasern zum einen nicht durch das ursprüngliche Axon und zum anderen von mehreren Neuronen innerviert werden. Dieses Phänomen wird als polyneuronal Reinnervation bezeichnet und als mögliche Ursache für die Defektheilung, die z.B. in Form von Bewegungsanomalien die Gesichtsmuskulatur betreffend auftritt, angenommen (Guntinas-Lichius et al., 2005).

Eine weitere Ursache für eine Defektheilung ist möglicherweise die mangelnde Remyelinisierung der aussprossenden Tochteraxone. So sind die Myelinscheiden nicht nur schmaler, sondern auch kürzer (Hall, 2005). Die Isolation der Axone sowie der Abstand zwischen den Ranvierschen Schnürringen sind dementsprechend verringert. Dies hat zur Folge, dass die fortgeleiteten Aktionspotentiale an Höhe verlieren und dass nur ein abgeschwächter Reiz den Zielmuskel erreicht.

Folgende Zeichen einer Defektheilung können auftreten (Finkensieper et al., 2012):

- Synkinesie: bei einer willkürlichen Gesichtsbewegung (z.B. Lidschluss) kann gleichzeitig eine andere unwillkürliche mimische Bewegung (Hebung des Mundwinkels) auftreten.
- Autoparalytisches Syndrom: bei gleichzeitiger Innervation antagonistischer mimischer Muskeln durch dasselbe Motoneuron kommt es zu keiner sichtbaren Bewegung
- Dyskinesie: bei einer willkürlichen Bewegung ist der Bewegungsablauf verändert oder abgeschwächt.
- Hyperkinesie: ist gekennzeichnet durch zu starke Bewegung der mimischen Muskulatur.

„Krokodilstränen“ können auch nach einer Fazialisläsion auftreten und sind im Sinne einer Defektheilung Ausdruck polyneuronaler Reinnervation (Jackler & Brackmann, 2004).

„Krokodilstränen“ treten beim Essen auf, wenn neben der physiologischen Speichelsekretion auch ein Tränenfluss einsetzt (Masuhr & Neumann, 2005).

2.4 Der Nervus facialis im Tiermodell

Das Fazialisnervmodell ist neben dem Femoralis- und Ischiadicusmodell eines der am häufigsten genutzten Tiermodelle, um die Degeneration und Regeneration nach peripherer Nervenläsion zu untersuchen (Moran & Graeber, 2004). Im Gegensatz zu den o.g. Nervenmodellen bietet das Fazialismodell einige Vorteile bei der Untersuchung peripherer Nervenregeneration.

So ist der N. facialis nach Austritt aus dem Foramen stylomastoideum ein rein motorischer Nerv (Punkt 2.1), führt demzufolge extrakraniell nur noch efferente Fasern (Moran & Graeber, 2004). Somit ist bei diesem Versuchsmodell die isolierte Manipulation und Untersuchung der De- sowie Regeneration efferenter Fasern unabhängig von den Afferenzen möglich (Guntinas-Lichius & Angelov, 2008).

Desweiteren hat sich das Fazialismodell aufgrund des schonenden operativen Vorgehens sowie der guten Zugänglichkeit etabliert (Moran & Graeber, 2004).

Zudem erlaubt das Fazialismodell neben morphologischen auch funktionelle Untersuchungen (Irintchev et al., 2010).

Die Vibrissenbewegung zeichnet sich durch eine nach rostral gerichtete aktive Protraktion und eine nach dorsal gerichtete passive Retraktion aus. Die Protraktion wird durch die Mm. arrector pili gesteuert, die über den R. buccalis n. facialis innerviert werden (Dorfl, 1985; Tomov, 2002).

Eine Läsion des Nervs hat dementsprechend eine Einschränkung der Vibrissenbeweglichkeit zur Folge. Das Ausmaß der Erholung der Vibrissenbeweglichkeit macht man sich zunutze, um die postoperative Nervenfunktion zu objektivieren. Die Bewegung der Barthaare wird dabei in Relation zum Kopf des Nagers gemessen. Es werden folgende Parameter ermittelt: der maximale Protraktionswinkel, der maximale Retraktionswinkel sowie die Amplitude

zwischen diesen Bewegungen, die Frequenz der Bewegung, die Winkelgeschwindigkeit und die Winkelbeschleunigung (Guntinas-Lichius & Angelov, 2008).

Die funktionelle Rehabilitation ist ähnlich wie beim Menschen auch bei der Ratte unvollständig (Irintchev et al., 2010). So finden sich bei der Ratte zwei Monate nach erfolgter Fazialisläsion eine eingeschränkte Vibrissenbeweglichkeit von ca. 20° (Tomov, 2002), die ähnlich wie beim Menschen als Resultat der Defektheilung nach Nervläsion zu werten ist. Aufgrund der funktionellen Defizite sind die Ausmaße der De- und Regenerationsmöglichkeiten zwischen der Ratte und dem Menschen gut vergleichbar. Somit ist das Fazialismodell der Ratte klinisch äußerst relevant.

2.5 Veränderungen im Fazialiskerngebiet nach alleiniger Läsion des N. facialis

Raslan et al. (2013) untersuchten experimentell den Einfluss einer isolierten Läsion des N. facialis auf das Kerngebiet und die funktionelle Erholung an der Ratte. Die Resultate der morphologischen und funktionellen Untersuchungen wurden mit denen der Sham-operierten Nager (=Kontrolltiere, lediglich operative Freilegung des Nervs ohne Läsion) verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden:

- Das Fazialiskerngebiet atrophierte auf der Seite der Läsion. Auf der kontralateralen Seite und bei der Sham-Gruppe zeigte sich diese Veränderung nicht.
- Die o.g. Verkleinerung des Kerngebiets war nicht durch einen Verlust oder die Atrophie von Motoneuronen bedingt. Die Größe und die Anzahl der Motoneurone blieben auch nach Fazialisläsion unbeeinflusst.
- Jedoch kam es zu einer signifikanten Abnahme von cholinergen und exzitatorischen (VGLUT2⁺) Synapsen auf der Seite der Nervendurchtrennung. Dies ließ sich im kontralateral gelegenen Kern und bei den Sham-Tieren nicht beobachten.
- Gleichzeitig nahm auch die Anzahl der inhibitorischen (VGAT⁺) Synapsen auf der Seite der Läsion ab. Langfristig war diese Verminderung von VGAT⁺ nicht signifikant. Auffällig war jedoch eine Zunahme von inhibitorischen Synapsen im kontralateralen Kern verglichen zu den Sham-Tieren.
- Die o.g. Veränderungen der Synapsenanzahl bedingte, dass das VGLUT2⁺/VGAT⁺-Verhältnis bei den Läsionsratten niedriger ausfiel als bei den Sham-Tieren.

In der Arbeit von Raslan et al. (2013) zeigte sich zudem bei den Ratten mit durchtrenntem N. facialis eine signifikante Verschlechterung der Amplitude der Vibrissenbewegung auf der Seite der Läsion im Vergleich zur kontralateralen Seite. Auch bei den Sham-operierten Tieren ließ sich weder rechts noch links eine Verringerung der Amplituden der Vibrissenbewegung beobachten.

3. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die neuronale Plastizität und funktionelle Erholung nach Fazialisläsion unter dem Einfluss einer Schädigung der sensorischen Rinde zu erhalten. Frühere Arbeiten zeigten, dass das Ausmaß des sensorischen Inputs über das trigeminale System einen entscheidenden Einfluss auf den Grad der funktionellen Erholung nach Läsion des Nervus facialis zu haben scheint. Im Rahmen dieses Projekts sollte die Hypothese geprüft werden, ob und inwieweit eine zusätzliches Trauma des somatosensorischen Kortex zu einer schlechteren funktionellen Erholung nach peripherer Fazialisläsion führt.

Während zwischen dem Ncl. facialis und anderen Hirnnervennuklei direkte Projektionen bestehen, gibt es auch indirekte Verbindungen, die über den Thalamus zum kontralateralen somatosensorischen Neokortex (Gyrus postcentralis) ziehen. So verlaufen sensible Afferenzen der Vibrissen über den Trigeminusnerv in somatotopischer Anordnung zum Barrel-Kortex. Von hier aus erfolgt die Verschaltung unter anderem in den Motokortex, der wiederum efferente Fasern an das Fazialiskerngebiet sendet. Die Unterbrechung dieser kortikalen Schleife mittels ischämischer Läsion (Photothrombose) und deren Auswirkungen auf die funktionelle Erholung der Vibrissen war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Auf dieser Grundlage sind folgende Aspekte zu berücksichtigen:

Zum einen stellt sich die Frage, ob die Unterbrechung einer supranukleär gelegenen Struktur Auswirkungen auf die Regeneration des peripheren N. facialis und auf die damit einhergehende funktionelle Erholung hat. Zu diesem Zweck wurden Ratten nach FFA rechts im Bereich des sensorischen Barrel-Kortex eine Photothrombose mit Hilfe des photosensiblen Farbstoffes Bengalrosa gesetzt.

Zum anderen galt es zu prüfen, ob die alleinige Injektion von Bengalrosa ohne nachfolgende Thrombosierung Effekte auf die Fazialisregeneration hatte. Hierzu wurde bei der verbleibenden Hälfte der Versuchstiere nach FFA rechtsseitig, ausschließlich der Farbstoff Bengalrosa verabreicht.

Um zu ermitteln, inwieweit sich eine die Photothrombose und die Bengalrosa-Injektion auf die neuronale Plastizität des Nucleus facialis auswirkten, wurde das Kerngebiet auf beiden Seiten hinsichtlich Größe, Synapsendichte und Motoneuronenmorphologie untersucht (Ergebnisse unter Punkt 5.1 – 5.5).

Zudem wurde eine Videoanalyse der Vibrissenbewegungen aus der Vogelperspektive durchgeführt, um die funktionelle Erholung zu objektivieren (Ergebnisse unter Punkt 5.6).

Außerdem galt zu klären, inwieweit die neuronale Plastizität des Nucleus facialis mit dem Ausmaß der funktionellen Regeneration in Zusammenhang zu bringen ist. Hierfür wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt (Punkt 5.7).

Aus der unter Punkt 2.6 zitierten Studie von Raslan et al. (2013) ging bereits die Auswirkungen auf die neuronale Plastizität und die Vibrissenbeweglichkeit nach ausschließlicher Durchtrennung des N. facialis hervor. Diese Arbeit wurde u.a. genutzt, um Vergleiche zu ziehen zwischen den Auswirkungen einer alleinigen FFA und zusätzlichen Faktoren (PT, Farbstoff-Injektion) (Details unter Punkt 6).

4. Materialien und Methoden

4.1 Tiere

Insgesamt wurden für die Versuchsreihe 16 männliche Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) genutzt.

Zu Beginn des Experiments waren die Tiere zwei Monate alt. Das durchschnittliche Gewicht pro Tier betrug ca. 330 g. Es erfolgte die Einteilung in zwei experimentelle Gruppen: die sham-operierten Tiere ($N = 8$), an denen man lediglich die Fazialis-Fazialis-Nervenanastomose (FFA) ohne Setzen einer Photothrombose nach Bengalrosa-Injektion vornahm, wurden mit den PT-Tieren ($N = 8$) verglichen, bei denen sowohl die FFA wie auch die Photothrombose (PT) erfolgte. Einzelheiten zum operativen Vorgehen sind dem Punkt 4.2 zu entnehmen.

Die Pflege der Ratten übernahmen ausgebildete Tierpfleger des Instituts für Versuchstierkunde und Tierschutz (IVuT) in Jena.

Die Tiere wurden zu viert in den üblichen für die Versuchstierhaltung vorgesehenen Käfigen ($43,5 \times 21,5 \times 61 \text{ cm} = B \times H \times T$) untergebracht. Der Zugang zu ausreichenden Mengen an Futter und frischem Wasser war stets gewährleistet.

Die Markierung der Tiere erfolgte mit Hilfe von Pikrinsäure. Die Kennzeichnung mit diesem gelben Farbstoff wurde auf dem Rückenfell der Ratten vorgenommen. Hierdurch konnten die einzelnen Tiere gut voneinander unterschieden werden, sodass eine doppelte oder eine ausbleibende Analyse eines Nagers nicht passieren konnte.

Die Behandlung der Tiere erfolgte in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz nach Genehmigung des Thüringer Landesamtes für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz.

4.2 Operatives Vorgehen

Es wurden zwei Operationen an den Ratten durchgeführt. Zuerst erfolgte die Durchtrennung mit anschließender Reanastomosierung des rechten N. facialis, in einem zweiten Schritt das Setzen einer Photothrombose im Bereich des Barrel-Kortex beiderseits.

4.2.1 Fazialis-Fazialis-Anastomose rechts

Bei allen Ratten wurde die Fazialis-Fazialis-Anastomose rechtsseitig durchgeführt.

Die Operationen wurden durch Prof. Guntinas-Lichius, Dr. Irintchev und Dr. Finkensieper aus der Klinik und Poliklinik der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Jena vorgenommen.

Die Tiere wurden zunächst durch die intramuskuläre Gabe eines Medikamentengemisches narkotisiert. Hierbei kamen folgende Wirkstoffe zum Einsatz:

- Medetomidin (Dormitor-R, Orion Farma, Espoo, Finnland, Dosierung: 0,15 mg/kg)
- Midazolam (Dormicum-R, Roche Pharma, Schweiz, Dosierung: 2 mg/kg)
- Fentanyl (Fentanyl-R Janssen, Janssen, Neuss, Deutschland, Dosierung: 0,005 mg/kg)

Nach Wirkeintritt des Narkosegemisches fanden folgende Operationsschritte statt:

Die rechte Wange wurde zuerst rasiert und die Haut mit Hilfe eines Skalpells inzidiert. Der Hauptstamm des rechten N. facialis wurde unter einem Mikroskop freipräpariert. Danach erfolgte die Durchtrennung des Nervs nach seinem Austritt aus dem Foramen styloideum und distal des Abgangs des N. auricularis posterior. Abbildung 4.1 zeigt die Höhe der Läsion.

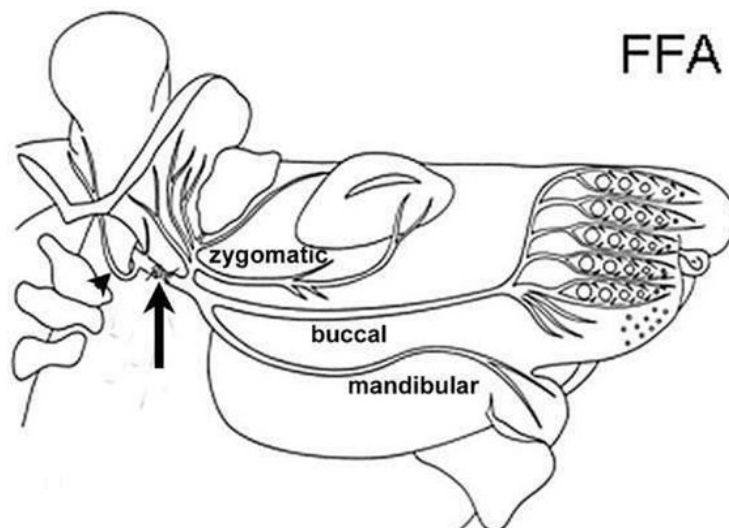


Abb. 4.1: Anatomische Darstellung des extratemporalen Verlaufs des Nervus facialis bei der Ratte. Unmittelbar nach dem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum entspringt der N. auricularis posterior und verläuft nach dorsal (▲). Weiter peripher zweigt der N. facialis sich in seine Endäste (Ramus zygomaticus, R. buccalis, R. mandibularis) auf. Distal des Abganges des N. auricularis posterior und proximal der Nervaufzweigung erfolgte die operative Durchtrennung und Reanastomosierung (Fazialis-Fazialis-Anastomose) des Nervus facialis (↑), übernommen aus Guntinas-Lichius et al. (2005).

Der proximale Nervenstumpf wurde wieder mit dem distalen Nervenstumpf durch zwei mikrochirurgische 11-0 atraumatische Nähte (Ethicon, Norderstadt, Deutschland) verbunden. Die Hautnähte erfolgten mit Hilfe von 4-0 Nähten (Ethicon, Norderstadt, Deutschland).

4.2.2 Photothrombose

Die beidseitige Läsion des sensorischen Barrel-Kortex wurde von Dr. Irintchev, Dr. Finkensieper und Frau H. Thieme, HNO-Klinik Jena, durchgeführt. In eine Reihe von Vorversuchen wurde die Methode für photothrombotische Läsion des Vorderpfoten-Areals des sensorischen Kortex der Ratte (Watson et al., 1985) von den o.g. Personen für den Barrel-Kortex optimiert. Die folgende kurze Beschreibung basiert auf Informationen von Dr. Finkensieper und H. Thieme.

Unmittelbar im Anschluss an die Fazialis-Fazialis-Läsion wurde bei den PT-Tieren die Präparation des Kopfes vorgenommen, um den Barrel-Kortex beidseits freizulegen.

Hierfür wurde in einem ersten Schritt die Schädelkalotte freigelegt und der M. temporalis teilweise reseziert. Darauffolgend spannte man die weiterhin narkotisierten Tiere in einem stereotaktischen Gerät (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland) ein, um den Barrel-Kortex beim so fixierten Schädel zu markieren. Dies erfolgte ausgehend vom Bregma (Schnittstelle zwischen Sutura coronalis und Sutura sagittalis). Von dieser Struktur wurden 0,25cm in kaudaler und jeweils 0,65cm nach rechts bzw. links abgemessen. Diese Punkte stellten nach „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“ (Paxinos & Watson, 2005) den Barrel-Kortex dar. Mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott, Jena, Deutschland) wurde nach durchgeführter intravenöser Injektion von 1 ml Bengalrosa (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) beide Barrel-Kortices für zehn Minuten belichtet.

Durch die Belichtung des Farbstoffes Bengalrosa kommt es zur Bildung freier Radikale, die im Gefäßsystem Endothelschädigungen und Thrombozytenaggregation hervorrufen (Watson et al., 1985, s. o.). Dies bedingt die Infarzierung im Bereich des Barrel-Kortex (A. Schmidt et al., 2012).

Das Vorgehen bei den sham-operierten Tieren glich dem der PT-Tiere. Auch ihnen wurde der Farbstoff injiziert, jedoch wurde der Barrel-Kortex nicht belichtet. Stattdessen wurden die Kontrollratten nach der Injektion für zehn Minuten mit der freipräparierten Schädelkalotte liegen gelassen, bevor die Wunde wieder vernäht wurde.

Nach erfolgter Operation erhielten die Ratten subkutan ein Antidot-Gemisch bestehend aus:

- Antipamezol (Antisedan-R, Orion Pharma, Espoo, Finnland, Dosierung: 0,75 mg/kg),
- Flumazenil (Anexate, Roche, Basel, Schweiz, Dosierung: 0,2 mg/kg) und
- Naloxon (Naloxon, CuraMedPharma, Karlsruhe, Deutschland, Dosierung: 0,4 mg/kg)

Diese Antidote garantierten eine Erholung innerhalb von fünf Minuten von der Narkose.

Um Lokalisation und Größe der kortikalen Läsion zu überprüfen wurde eine Woche nach der Operation eine MRT-Untersuchung durchgeführt (M. Finkensieper, persönliche Mitteilung). Alle hier verwendeten Tiere entwickelten eine kortikale Läsion im Bereich des Barrel-Kortex (Abb. 4.2). Hier zeigte sich im Bereich des Barrel-Kortex im Vergleich zum umliegenden Gewebe eine deutlich hyperintense Veränderung, die auf eine erfolgreiche Infarzierung dieses Kortexgebietes hindeutet (M. Finkensieper, A. Irintchev, persönliche Mitteilung).

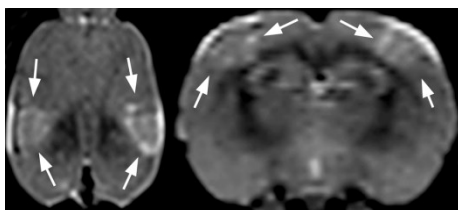


Abb. 4.2: T1-gewichtetes MRT des Hirnes eines PT-Tieres in sagittaler (links) und coronarer (rechts) Schnittebene. Pfeile kennzeichnen hyperintense Kortexgebiete.

4.3 Videoaufnahmen und digitale Bildanalyse

Acht Wochen nach den Operationen wurden von allen Tieren Videoaufnahmen angefertigt, die das Bewegungsausmaß der Vibrissen im Seitenvergleich dokumentierten und zur Analyse der funktionellen Erholung herangezogen wurden.

Da Ratten eine Vielzahl von Tasthaaren im Gesicht aufweisen, wurden bis auf zwei Vibrissen pro Seite alle übrigen Tasthaare mit einer Schere entfernt. Es wurden stets zwei Vibrissen

der C-Reihe (entspricht der dritten Reihe von dorsal) auf jeder Seite erhalten (Angelov et al., 2007).

Im Anschluss nahm man von jedem Tier ca. drei bis fünf Minuten ein Video aus der Vogelperspektive auf. Die Aufnahme erfolgte bei künstlicher Beleuchtung auf einem schwarzen Untergrund mit einer Hochgeschwindigkeitsvideokamera (AVT Pike F-032, 100 Bilder pro Sekunde, Allied Vision Technologies, Stadtroda, Deutschland). Zur Steuerung der Kamera wurde die Bewegungsanalyse-Software SIMI-Motion (SIMI Reality Motion Systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) genutzt. Während der Aufzeichnung wurde versucht, die Ratten mit verschiedenen Gegenständen wie Futter oder Spielzeug zu stimulieren, um das größtmögliche Bewegungsausmaß der Vibrissen zu erhalten.

Die Auswertung der Videos geschah mit Hilfe der Computerprogramme „VirtualDub Version 1.6.19“ (a videocapture/processing utility written by Avery Lee) und „Image Tool Version 2“ (University of Texas, San Antonio, TX, USA). Mit VirtualDub konnten die Videodateien zunächst bearbeitet und letztendlich als einzelne Bildelemente (Videoframes) gespeichert werden. Diese Videoframes wurden dann in das Programm „Image Tool“ übertragen, mit welchem die Ermittlung der Winkel stattfand. Hierfür wurden die Vibrissen zur Sagittallinie verlängert. Die Sagittale ergab sich als Linie zwischen der Nasenspitze und dem Scheitel, die im idealen Fall die Senkrechte zu der Geraden bildet, die zwischen den Innenwinkeln beider Augen liegt (Pavlov et al., 2008). Der Winkel, den die verlängerten Tasthaare und die Sagittale einschlossen, wurde je nach Ausrichtung der Vibrisse als Protraktions- bzw. Retraktionswinkel gewertet. Pro Seite erfolgten immer ca. zehn Messungen für die maximale Vor- und Rückbewegung bei jedem Tier.

Die Bewegungsspanne zwischen Protraktion und Retraktion wird als Amplitude bezeichnet. Normalerweise beträgt die Amplitude ca. 50 - 60° (Angelov et al., 2007; Tomov, 2002).

Anhand der Bezeichnungen der Videodateien konnte keine Zuordnung der Tiere zu den Gruppen vorgenommen werden, sodass eine unvoreingenommene Analyse der Daten möglich war. Erst nach der erfolgten Videoauswertung wurden die Ratten der stereologischen Analyse wieder in ihre Gruppe eingeordnet.

4.4 Histologische Untersuchungen des Fazialiskerngebiets

Die histologischen Untersuchungen wurden nach Irintchev et al. (2005) und Raslan et al. (2013) durchgeführt.

4.4.1 Gewebefixierung und Schnitttechnik

Die transkardiale Perfusion der Tiere erfolgte 13 Wochen nach der operativen Intervention (Punkt 4.2.1 & 4.2.2). Die Ratten wurden hierfür zunächst narkotisiert. Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland). Nach Wirkungseintritt wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert und fixiert. In einem weiteren Schritt wurden mittels Haut- und Muskelschnitte die abdominellen Organe und das thorakale Skelett freigelegt. Mit einer Pinzette wurde das Processus xiphoideus fixiert, um nachfolgend mit einer Schere die Rippen vom Sternum zu trennen. Der so freigelegte, schlagende Herzmuskel konnte dann mit einer Pinzette quer umschlossen werden, um desweiteren eine Inzision am Apexbereich vorzunehmen. Über diesen Schnitt konnte dann die Perfusionslösung transkardial zur Fixation zugeführt werden. Die Lösung bestand aus 4% Formalaldehyd in 0,2M Kakodylat-Puffer, pH 7,3 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Regio Analog, Ismatec, Zürich, Schweiz) für 15 Minuten in den Nagerkreislauf zur Gewebefixation injiziert.

Nach beendeter Perfusion wurde die Schädelhöhle eröffnet und der Hirnstamm präpariert. Hierzu wurden die Tiere auf den Bauch umgelagert, um auf Höhe der Schulterblätter einen Hautschnitt zu setzen. Nach erfolgter Präparation bis zum Nackenbereich konnte das Nagerhirn im Anschluss an die Durchtrennung von Wirbelsäule und Rückenmark sowie Ablösung der Schädelplatte freigelegt werden. Hiernach konnte das Hirngewebe entnommen und für 24 Stunden bei 4°C in die o.g. Perfusionslösung gelegt werden. Danach wurde das Material in eine fünfzehnprozentige Saccharoselösung in PBS (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) getaucht und zwei Tage lang auch bei 4°C gelagert. Darauf folgend

wurde das Gewebe in einer auf -80°C vorgekühlten 2-Methylbutan (Isopentan)-Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) eingefroren.

Das Schneiden des Gewebes erfolgte am Kryostat (CM3050; Leica, Nussloch, Deutschland). Hierbei wurden 25 µm dicke Transversalschnitte angefertigt und auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) angeordnet. Dies erfolgte nach einem standardisierten Prinzip (Abb. 4.3).

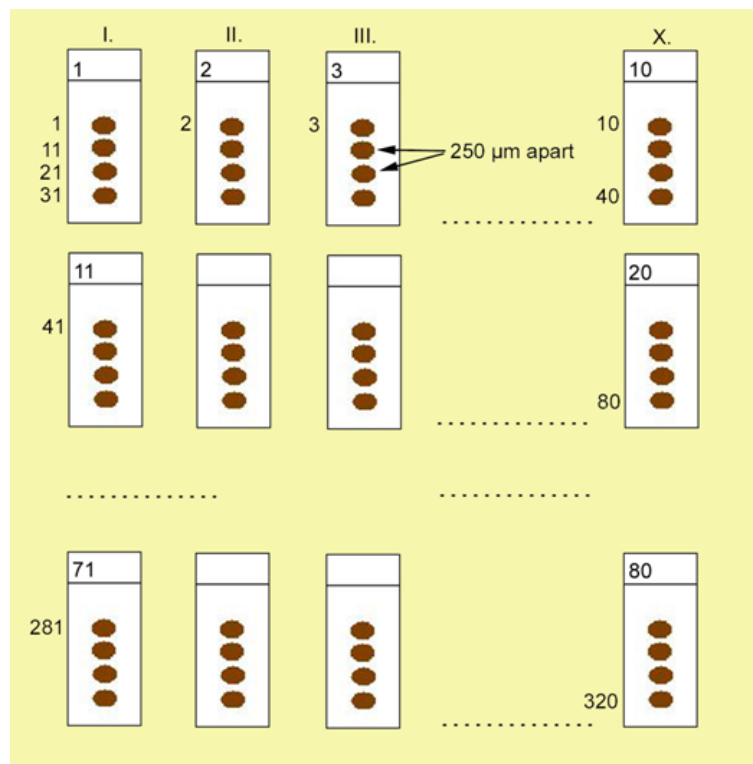


Abb. 4.3: Darstellung der standardisierten Anordnung der Querschnitte.

Zehn OT wurden fortlaufend mit je einem Schnitt bestückt. Die zweite Reihe begann mit dem elften Hirnstammschnitt, sodass bei einer Schnittdicke von 25 µm benachbarte Schnitte eines Objektträgers jeweils 250 µm voneinander entfernt waren.

Die Schnitte wurden fortlaufend auf zehn Objektträgern (OT) aufgetragen. Der elfte Schnitt wurde wieder auf den OT mit dem ersten Schnitt aufgetragen. So fuhr man fort bis der gesamte Hirnstamm in Schnittform auf den Objektträgern vorlag. Jeder OT trug letztendlich ungefähr fünf bis sechs Schnitte, wobei bei einer Schnittdicke von 25µm benachbarte Schnitte einen Abstand von 250µm aufwiesen.

Bis zur Färbung wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

4.4.2 Antikörper

Für die Färbung wurden die folgenden Antikörperlösungen genutzt:

Primärantikörper:

- Maus Anti-Vesikulärer-GABA-Transporter (VGAT⁺, 1:500; Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland). VGAT⁺ ist ein vesikuläres, transmembraneres Transportprotein, das abhängig von einem elektrochemischen Gradienten den inhibitorischen Neurotransmitter GABA aufnimmt oder abgibt.
- Kaninchen Anti-Vesikulärer-Glutamat-Transporter 2 (VGLUT2⁺, 1:1000, Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland). VGLUT2⁺ ist ein vesikuläres, transmembraneres Transportprotein, das abhängig vom elektrochemischen Gradienten den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat aufnimmt oder abgibt.
- Ziege Anti-Cholinacetyltransferase (ChAT, 1:500; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Die Cholinacetyltransferase ist ein Enzym, das die Bildung von Acetylcholin katalysiert, einem Neurotransmitter, welches in cholinergen Synapsen gespeichert ist.

Sekundärantikörper:

- Cy3- (Cyanin) konjugierte Ziege Anti-Maus, Ziege Anti-Kaninchen, Esel Anti-Ziege (1:200, Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg, Deutschland)

Alle Antikörper waren in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), pH 7,3 gelöst. Die Lösung fungierte als Puffer und enthielt weiterhin:

- 0,5% Lambda-Carrageen (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- 0,02% Natriumazid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Vor der Inkubation mit den o.g. Antikörpern wurden die Schnitte zunächst mit Esel- bzw. Ziegenserum (Jackson ImmunoResearch) inkubiert, um die unspezifischen

Antikörperbindungen zu blockieren. Zu beachten war, dass das Serum und der Sekundärantikörper von derselben Spezies (Ziege bzw. Esel) stammen mussten.

4.4.3 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden in einem ersten Schritt bei 37°C über Nacht getrocknet. Danach wurden die OT für 30 Minuten bei 80°C in einer 0,01 M Natriumcitrat-Lösung inkubiert. Dies diente der Antigendemaskierung (antigen retrieval).

Nach Abkühlung der OT wurden diese kurz mit PBS-Lösung gespült. Anschließend wurden die Schnitte je nach gewünschter Färbung mit einer fünfprozentigen Serumlösung der jeweiligen Spezies (Ziege bzw. Esel)(Punkt 4.3.2) für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Normalserum war in PBS gelöst und enthielt außerdem:

- 0,2% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 0,02% Natriumazid

Darauf folgte die Inkubation der Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper (Punkt 4.3.2) in einer Plastik-Küvette (Art.-Nr. 2306.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei 4°C für drei Tage. Nach dieser Zeit wurden die OT aus den Küvetten entfernt und dreimal für je 15 Minuten mit PBS gespült, um verbliebene Reste des Primärantikörpers auszuwaschen.

In einem weiteren Schritt wurden die OT für zwei Stunden in die Lösung eingetaucht, die den Sekundärantikörper enthielt. Dies fand bei Zimmertemperatur statt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte erneut für jeweils 15 Minuten dreimal mit PBS gewaschen, ebenfalls bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit der grün fluoreszierenden Nissl-Färbung (NeuroTrace, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Die Färbungslösung war im Verhältnis 1:200 in PBS verdünnt. In diese Lösung wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Zimmertemperatur eingetaucht, um sie anschließend mit PBS zu spülen. Hierdurch sollten die Schnitte von überflüssiger Färbungslösung gereinigt werden. Die Inkubation mit der Färbelösung sowie die Waschung mussten unter einer Abdeckung stattfinden, da die Nissl-

Färbung lichtempfindlich ist und mit andauernder Lichtexposition zunehmend unbrauchbar wird.

Nach dem Auftragen eines Eindeckmediums (Fluoromount-G, Southern Biotechnology, Eching, Deutschland), der die Fluorezenzfarbstoffe vor der Ausbleichung schützen sollte, wurden die Schnitte schlussendlich eingedeckelt. Die Lagerung der OT bis zur mikroskopischen Untersuchung erfolgte unter Lichtverschluss bei 4°C in einer Kältekammer.

4.5 Histologische Auswertungen

4.5.1 Stereologische Analyse

Für die stereologische Analyse wurde die Optical-Disector-Methode herangezogen. Die Effizienz dieser Methode besteht darin, dass mit ihrer Hilfe die Dichte einer ausgewählten Struktur innerhalb einer vorgegebenen Organregion sogar in einem dicken histologischen Schnitt ermittelt werden kann (Howard & Reed, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Verfahren die Dichte exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen im Fazialiskerngebiet bestimmt, um in einem weiteren Schritt durch Multiplikation dieser Größe mit dem Kernvolumen die absolute Anzahl der entsprechenden Synapse zu erhalten:

$$N_{\text{Synapse}} = V_{\text{Kern}} \times N_V_{\text{Synapse}}$$

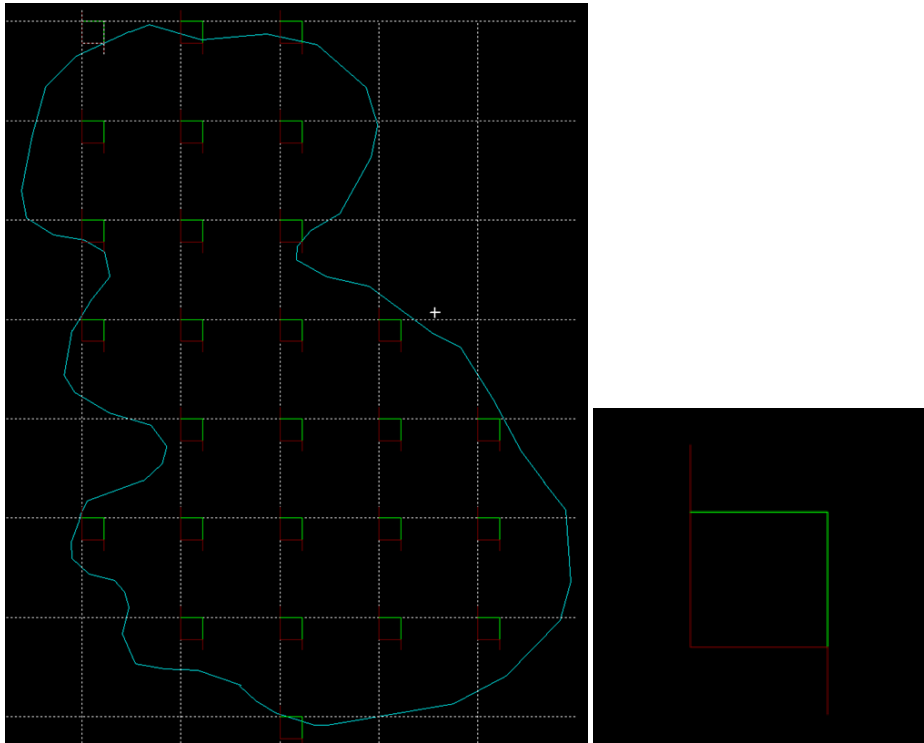


Abb. 4.4: Optical-Disector-Methode für die stereologische Analyse am Mikroskop.
links: Umriss (hellblau) des Fazialiskerngebiets in einem histologischen Schnitt mit gleichmäßig angeordneten Disektoren.
rechts: Vergrößerung eines Disektors . Synapsen, die die **grüne** Linie berührten, wurden gezählt. Synapsen, die die **rote** Linie berührten, wurden nicht mitgezählt.

Die Maße des „Optical Disector“ (im Folgenden vereinfacht nur noch „Disektor“ genannt) wurden vor Beginn der Auszählung festgelegt (s. unten), wobei die Tiefe des Disektors innerhalb der Schnittdicke lag. Der Disektor wurde ober- und unterhalb von zwei Ebenen begrenzt, die jeweils 2 μm stark waren. Dies sollte Fehler bei der Auszählung verhindern, die durch eine unebene Schnittfläche entstanden wären.

Objekte, in unserem Fall Synapsen, die innerhalb und auf der grünen Linie (entspricht der „acceptance line“) des Disektors lagen, wurden nach den Regeln der stereologischen Analyse gezählt. Synapsen, die außerhalb bzw. auf der roten Linie (entspricht der „rejection line“) des Disektors lagen, wurden hingegen nicht mitgezählt.

Die Anwendung von Disektoren diente als Auswahlverfahren, um eine Zufallstichprobe aus der Grundgesamtheit zu erhalten.

Die Untersuchung wurde mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Axioskop 2 mot plus, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt, der mit einem motorisierten computergesteuerten

Objektträgtisch ausgestattet war. Zur Auswertung am Computer wurde die „Stereo Investigator 8“-Software (MicroBrightField, Williston, Vermont, USA) verwendet.

Mit Hilfe des fünffachen Objektivs (Plan-Neofluar, Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland) wurde zunächst das Fazialiskerngebiet aufgesucht. Dieser ist in der grün fluoreszierenden Nissl-Färbung (Fluoreszenz-Filter-Satz 10, Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland) gut von umliegenden Strukturen abgrenzbar. Mit einem Cursor wurde das Kerngebiet umrandet, wodurch eine geschlossene Fläche entstand, deren Inhalt wiederum für die Volumenbestimmung wichtig war (Punkt 4.4.2).

Die Analyse der VGAT⁺- und VGLUT2⁺-Synapsen erfolgte nach Auftragen eines Immersionsöls mit einem 100-fachen Objektiv und dem Fluoreszenz-Filter-Satz 15 (Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland). Hierdurch wurden die Synapsen als rot fluoreszierende Punkte sichtbar. Unter Verwendung der Optical-Disector-Methode wurden die Synapsen nach einem bestimmten Schema ausgezählt.

Hierfür wurden zunächst die Einstellungen der Disektoren vorgenommen. Ein Disektor hatte eine Größe von 10x10 µm und eine Tiefe von 5 µm. Damit hatte jeder Disektor ein Volumen von 500 µm³. Innerhalb dieses Volumens wurde die Anzahl der Synapsen ermittelt. Hierbei wurden jedoch nur Synapsen mitgezählt, die innerhalb des Disektors lagen oder die obere und untere (grüne) Linie von innen oder außen berührten. Strukturen, die außerhalb des Disektors oder an der unten und links (roten) Linie angrenzten, wurden hingegen nicht mitgezählt. Wenn die Auswertung eines Disektorvolumens abgeschlossen war, nahm man sich den nächsten vor, wobei die Disektoren in einer Achsenlänge von 180x180 µm im Kerngebiet verteilt waren. Die Ergebnisse dieser Analyse lassen sich unter den Punkten 5.2, 5.3 und 5.4 nachlesen.

Auch bei der Motoneuronen- und ChAT⁺-Auswertung kam zunächst das fünffache Objektiv zum Einsatz, denn auch hier wurde in einem ersten Schritt das Fazialiskerngebiet umrandet. Im weiteren Verlauf wechselte man zum 40-fachen Objektiv und dem o.g. Fluoreszenz-Filter-Satz 15, wodurch die Motoneurone und die cholinergen Synapsen gut zur Darstellung kamen.

Zur Ermittlung der Motoneuronenfläche und der ChAT⁺-Häufigkeit wurde wieder mit einem Disektor gearbeitet. Dieser war diesmal jedoch 60 x 60 µm groß und umfasste die gesamte

Schnittdicke. Die Disektoren hatten hier einen Abstand von 180 μm in der x- und y-Achse. Motoneurone, die sich innerhalb des Disektors befanden, wurden mit dem Cursor umrandet. Dadurch wurde der Umfang (=Perimeter) und die Fläche des Motoneurons bestimmt. Im gleichen Untersuchungsgang konnten auch die an der Motoneuronenoberfläche ansetzenden ChAT⁺-Synapsen ausgezählt werden. Hierbei ergab sich die Synapsenanzahl pro Perimeter, was der Häufigkeit (1/mm) der Synapsen entspricht.

Um die Anzahl der Motoneurone zu ermitteln, war es auch wieder nötig, das Fazialiskerngebiet in jedem Schnitt mit dem Cursor zu umranden. Mit dem 40-fachen Objektiv und dem bereits erwähnten Fluoreszenz-Filter-Satz 15 wurde das Kerngebiet nach diesen Zellen abgesucht. Jedoch wurden nur die Motoneurone gezählt, bei denen der Nukleolus des Zellkerns auch gut sichtbar war. Mit Hilfe des nach Cavalieri geschätzten Kernvolumens (Punkt 4.4.2) konnte die absolute Motoneuronenanzahl errechnet werden.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind unter Punkt 5.5 aufgeführt.

Ausgehend von den Ergebnissen der histologischen und funktionellen Untersuchungen konnte eine Korrelationsanalyse erstellt werden. Dies wurde m.H. des Rangkorrelationskoeffizients nach Spearman ρ durchgeführt. Dieser Parameter beschreibt, inwieweit ein Zusammenhang zwischen zwei Variablen besteht. Der p-Wert lag auch hier wieder bei 0,05 (Punkt 5.7).

4.5.2 Volumenschätzung nach dem Cavalieri-Prinzip

Um die absolute Anzahl N der inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen sowie der Motoneuronen zu ermitteln, war es nötig, zunächst das Volumen des Fazialiskerngebiets zu bestimmen. Dies geschah mit Hilfe des Cavalieri-Prinzips. Jene Methode geht auf den italienischen Mathematiker Bonaventura Cavalieri (1598-1647) zurück. Das von ihm entwickelte Prinzip ist ein weit verbreitetes und vielfach eingesetztes Verfahren zur Volumenbestimmung von Objekten (Howard & Reed, 1998).

Grundlegend liegt die Struktur in Schnitten vor, wobei zwischen den einzelnen Schnitten eines Objektträgers immer ein konstanter Abstand T besteht. In der Regel ist ein Objekt in

mehreren Anschnitten sichtbar. Durch Umrandung der Struktur in jedem Schnitt erhält man die Fläche A.

Das Gesamtvolumen lässt sich folgendermaßen ermitteln:

$$V = T \times (A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + \dots + A_n)$$

Bezogen auf die Volumenbestimmung des Fazialiskerngebiets wurde wie folgt vorgegangen: Das Kerngebiet wurde zunächst von den umgebenden Hirnarealen abgegrenzt. Hierfür nutzte man die Nissl-Färbung, in der sich die Motoneurone des Ncl. facialis durch ein deutlich helleres Grün vom umgebenden Gewebe abhoben. Mit Hilfe des Cursors wurde dieses Gebiet umrandet und so von einer Linie umschlossen. Das „Stereo Investigator“-Programm errechnete die eingefasste Fläche A. Auf diese Weise wurde bei allen Schnitten eines Tieres vorgegangen, die das Fazialiskerngebiet enthielten. In einem letzten Schritt wurden die Flächen addiert und mit der Tiefe *T* (Abstand zwischen zwei nebeneinander liegenden Schnitten auf einem OT, hier 250 µm) multipliziert (s.o.).

Die Ergebnisse der Volumenschätzung nach Cavalieri sind unter dem Punkt 5.1 nachzulesen.

4.6 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe des „Axioskop 2“-Mikroskops, welches auch zur stereologischen Analyse herangezogen wurde (Punkt 4.4.1). Dieses Mikroskop war auch mit einer Digitalkamera CX9000 (MicroBrightField) ausgestattet.

Die Bilder wurden direkt als Foto-Datei im TIF-Format gespeichert, um anschließend mit dem Fotoprogramm „Adobe Photoshop CS2“ (Adobe Systems, München, Deutschland) hinsichtlich Schärfe, Kontrast und Helligkeit bearbeitet zu werden.

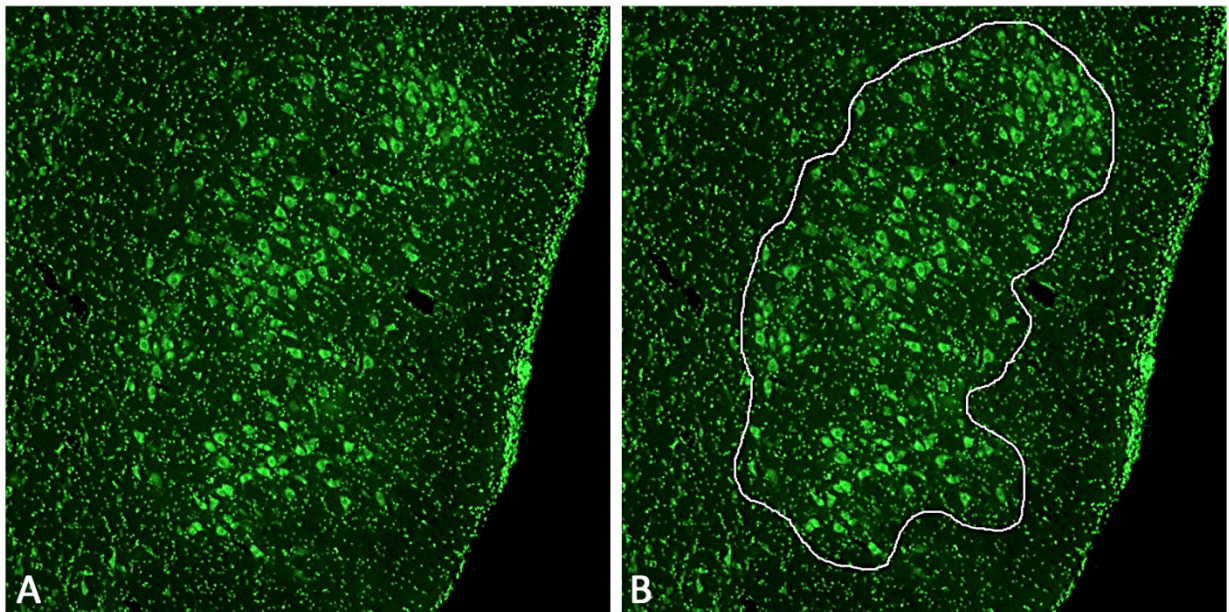
4.7 Statistik

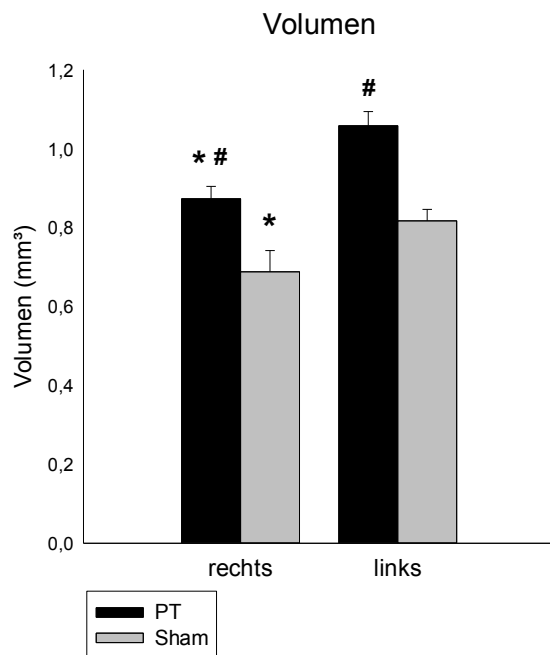
Mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchung wurde zunächst eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Damit ließ sich feststellen, ob – bezogen auf einen Analyseparameter – ein signifikanter Effekt zwischen den Gruppen bzw. Seiten besteht. Fand sich hier ein signifikanter Unterschied, wurde anschließend der Holm-Sidak-Test angewendet. Dieser eignet sich zur Prüfung, welche Gruppen bezüglich ihrer Mittelwerte differieren. Das Signifikanzniveau lag bei diesem Test bei $p = 0,05$. Ein kleinerer p-Wert bedeutet demzufolge, dass der ermittelte Unterschied zwischen zwei Gruppen als signifikant zu werten ist. Entsprechend handelt es sich bei $p > 0,05$ um einen nicht signifikanten Unterschied.

5. Ergebnisse

5.1 Volumen

Zunächst wurden die Volumina der Fazialiskerngebiete zwischen der PT- und Kontrollgruppe verglichen (Abb. 5.1):





C

Abb. 5.1: Volumenanalyse des Fazialiskerngebiets.

A) Histologische Darstellung des linken Nucleus n. facialis mittels grün fluoreszierender Nissl-Färbung in fünffacher Vergrößerung ohne Umrandung.

B) Histologische Darstellung desselben unter „A“ gezeigten Fazialiskerngebiets in fünffacher Vergrößerung mit Umrandung.

C) Volumina des linken und rechten Fazialiskerngebiets der PT- und Sham-Tiere 8 Wochen nach FFA rechtsseitig und systemischer Bengalrosa-Injektion. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur kontralateralen Seite (*) und zur Sham-Gruppe (#) (ANOVA gefolgt von Holm-Sidak-Test).

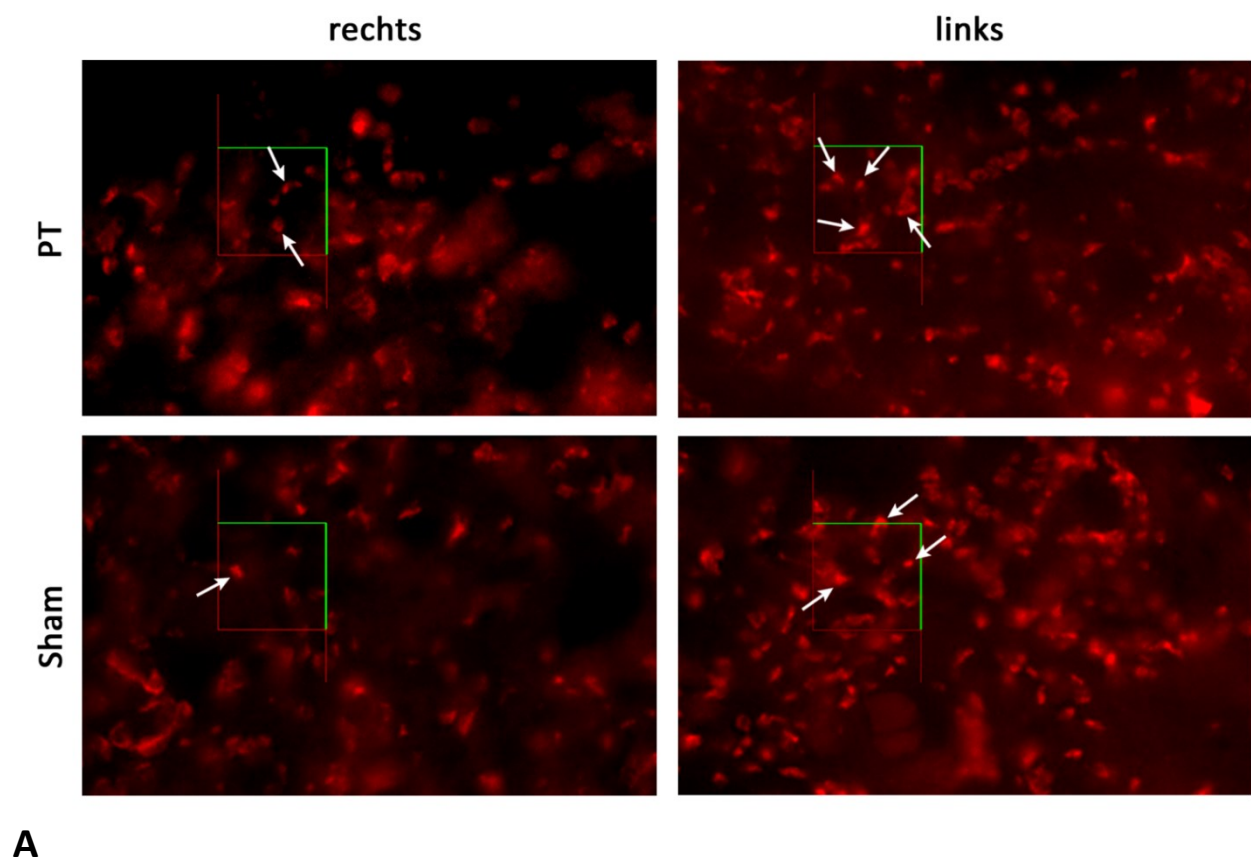
Bei den PT-Tieren zeigte sich, dass der rechte Fazialiskerngebiet ein signifikant kleineres Volumen aufwies als die kontralaterale Seite (-17,5%, $p = 0,009$).

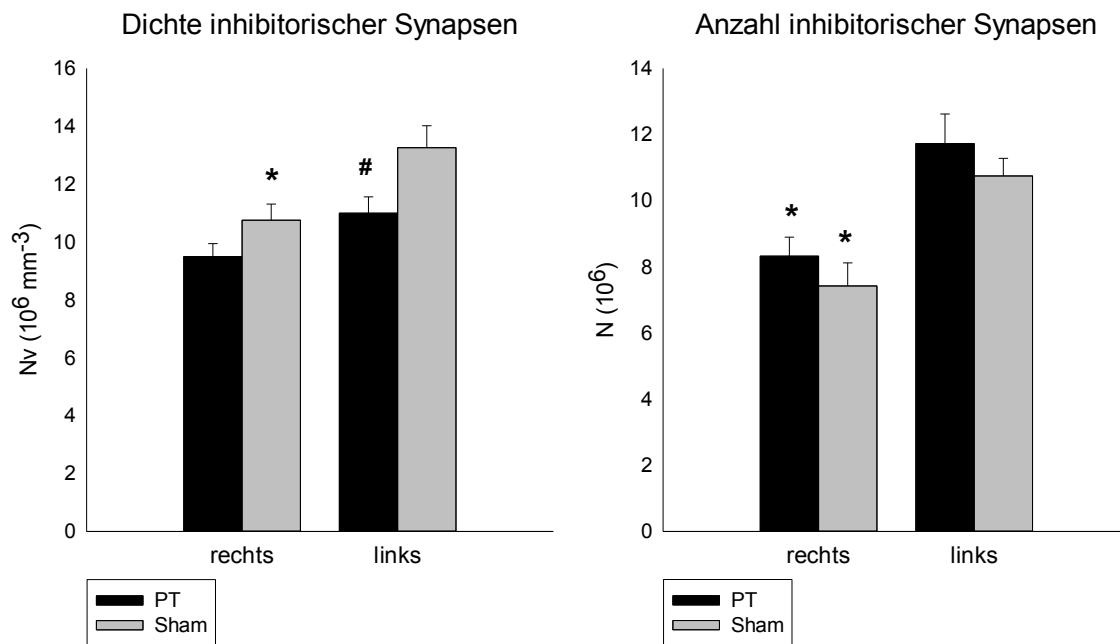
Auch bei den Sham-Ratten ließ sich feststellen, dass das Volumen auf der operierten Seite im Vergleich zum kontralateralen Kern vermindert ist (-15,7%). Dieser Unterschied ist mit $p = 0,05$ als annähernd signifikant zu werten. Betrachtet man dieses Ergebnis isoliert, so ist davon auszugehen, dass die o.g. Differenz auf den Einfluss der FFA zurückzuführen ist.

Jedoch wurden die beiden Tiergruppen auch miteinander verglichen, wobei hier immer die gleiche Seite gegenübergestellt wurde (PT rechts vs. Sham rechts, PT links vs. Sham links). Auch hier haben sich Unterschiede ergeben. Es fiel auf, dass die Kernvolumina der Sham-Tiere beiderseits deutlich kleiner sind verglichen mit denen der PT-Tiere ($p_{re} = 0,009$, $p_{li} < 0,001$). Somit liegt die Vermutung nahe, dass bei der Sham-Gruppe das verminderte Kernvolumen rechtsseitig nicht nur auf den FFA-Effekt zurückzuführen ist, sondern auch auf die Injektion des Farbstoffes.

5.2 Anzahl und Dichte inhibitorischer (VGAT⁺) Synapsen

Nach erfolgter Volumenanalyse der Kerngebiete konnten diese Ergebnisse für die weitere Auswertung herangezogen werden. So war es möglich, mit Hilfe der Volumina bei bekannter Dichte die absolute Anzahl N inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen zu bestimmen (Abb. 5.2 und 5.3).





B

C

Abb. 5.2: Analyse inhibitorischer (VGAT⁺) Synapsen des Fazialiskerngebiets.

A) Darstellung der VGAT⁺-Synapsenfärbung in 100-facher Vergrößerung mit einem projiziertem Dissektor. Die Pfeile (↑) markieren einige der gezählten Synapsen.

Dichte Nv (B) und Gesamtzahl N (C) der VGAT⁺-Synapsen im Fazialiskerngebiet der PT- und Sham-Tiere 8 Wochen nach der operativen Behandlung. Abgebildet sind Mittelwerte und SEM. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur kontralateralen Seite (*) und zur Sham-Gruppe (#) (ANOVA gefolgt von Holm-Sidak-Test).

Wie in Abb. 5.2B ersichtlich, konnten bei der Analyse der Dichte von VGAT⁺-Synapsen signifikante Unterschiede festgestellt werden. So zeigte sich bei den Kontrolltieren eine deutliche Reduktion der Dichte hemmender Synapsen auf der Seite der Läsion im Vergleich zur gesunden Seite (-19%, $p = 0,028$, Abb. 5.2 B). Generell ergab sich eine geringere Dichte hemmender Synapsen bei den PT-Tieren, wobei sich hier innerhalb der Versuchsgruppe keine signifikanten Besonderheiten einstellten ($p = 0,231$).

Jedoch stellte sich beim Vergleich zwischen den Gruppen heraus, dass die nicht operierte Seite der PT-Tiere eine deutlich verminderte VGAT⁺-Dichte aufwies als die Sham-Gruppe (-19%, $p = 0,046$, Holm-Sidak-Test, Abb. 5.2 B). Ein solcher Unterschied war bei der Gegenüberstellung der lädierten Seiten nicht auszumachen.

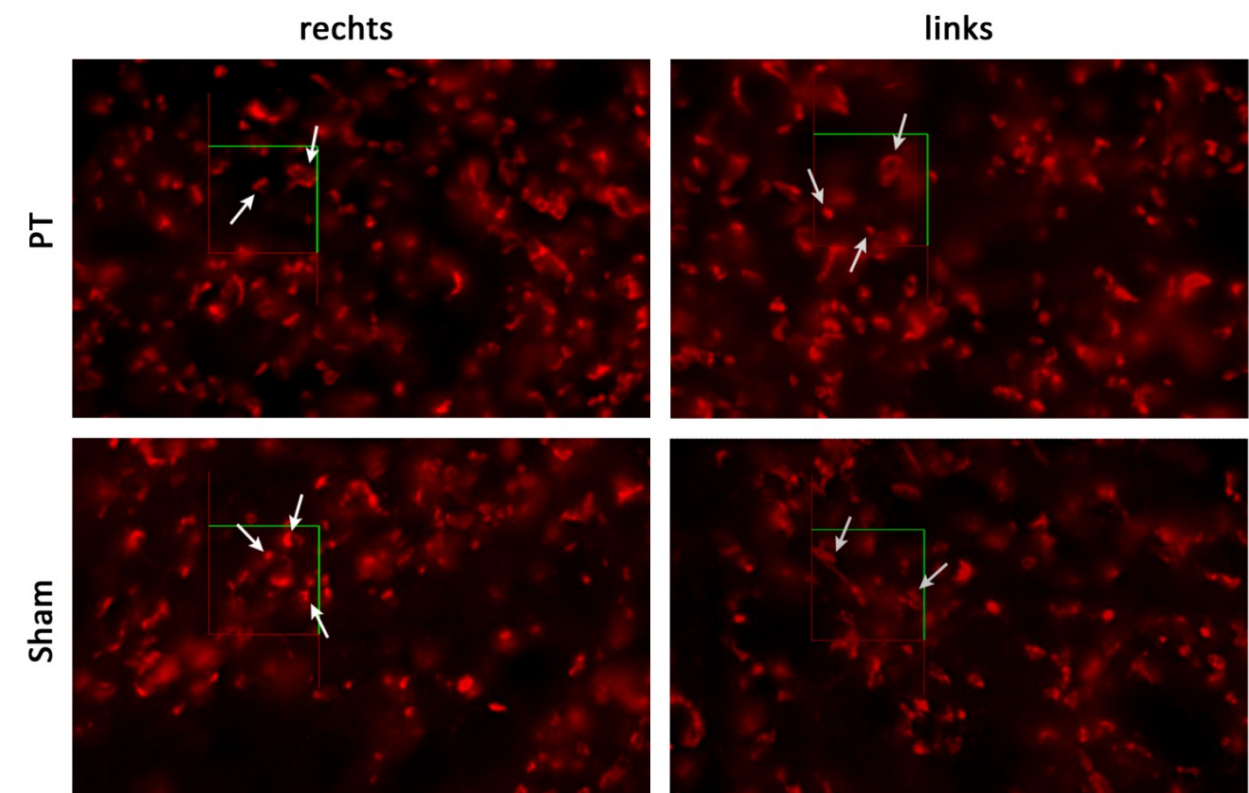
Bezüglich der absoluten Anzahl inhibitorischer Synapsen (Abb. 5.2 C) zeigte sich bei den PT-Ratten, dass das rechte Fazialiskerngebiet deutlich weniger VGAT⁺-Synapsen aufweist als das Kerngebiet auf der gesunden Seite (-29%, $p = 0,008$). Auch bei der Sham-Gruppe stellte sich

hinsichtlich der Anzahl hemmender Synapsen ein signifikanter Unterschied ein. So lag auch hier auf der lädierten Seite eine deutlich geringere Menge an VGAT⁺-Synapsen vor als im linken Kerngebiet (-31%, $p = 0,008$). So kann zunächst festgestellt werden, dass die operierte Seite beider Gruppen signifikant weniger Synapsen enthält als die linken Fazialiskerngebiete. Vergleicht man jedoch nun die beiden Gruppen miteinander, ist erkennbar, dass zwar die Sham-Tiere beiderseits eine leicht geringere Anzahl inhibitorischer Synapsen aufweisen, diese Differenz jedoch nicht signifikant ausfällt.

Zusammenfassend kann bisher gesagt werden, dass die Sham-Nager trotz geringerer Anzahl hemmender Synapsen eine deutlich höhere Synapsendichte aufweisen als die PT-Tiere, begründet durch die deutlich geringeren Kernvolumina in dieser Gruppe (Punkt 5.1).

5.3 Anzahl und Dichte exzitatorischer (VGLUT2⁺) Synapsen

Neben den inhibitorischen kamen auch die exzitatorischen Synapsen in einer weiteren Färbung zur Darstellung.



A

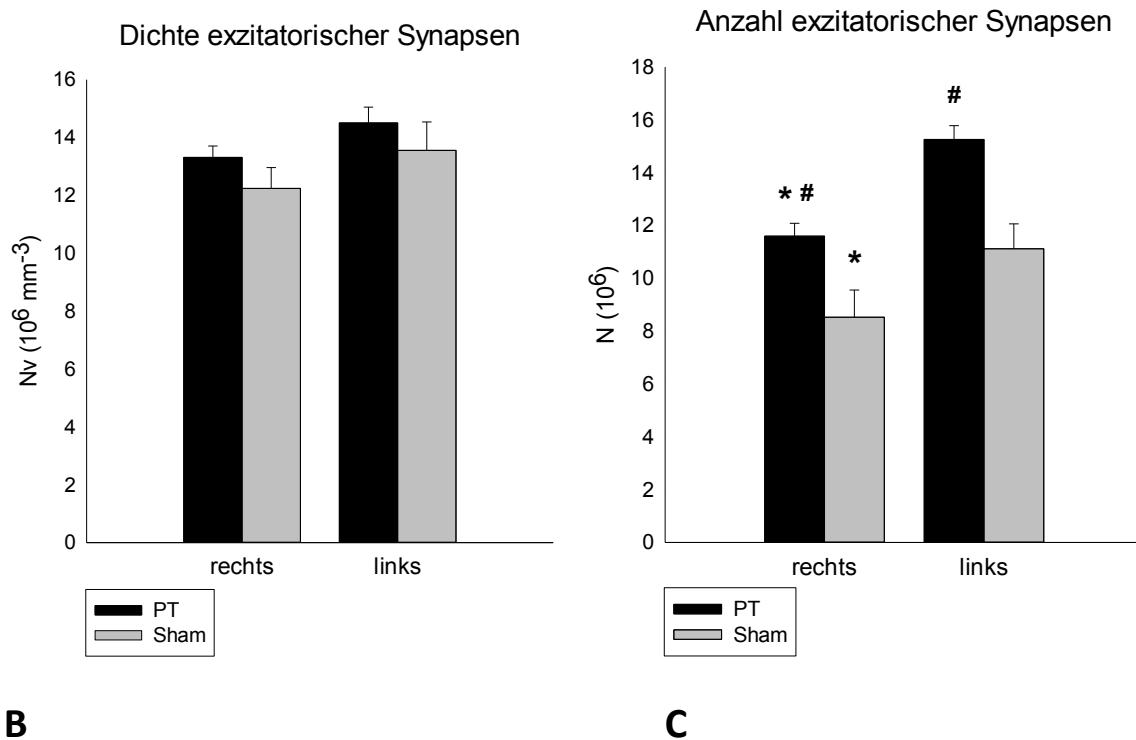


Abb. 5.3: Analyse exzitatorischer (VGLUT2⁺) Synapsen des Fazialiskerngebiets.

A) Darstellung der VGLUT2⁺-Synapsenfärbung in 100-facher Vergrößerung mit einem projiziertem Dissektor. Die Pfeile (↑) markieren einige der gezählten Synapsen.

Dichte Nv (B) und Gesamtzahl N (C) der VGLUT2⁺-Synapsen im Kerngebiet der PT- und Sham-Tiere 8 Wochen nach der operativen Behandlung. Abgebildet sind Mittelwerte und SEM. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur kontralateralen Seite (*) und zur Sham-Gruppe (#) (ANOVA gefolgt von Holm-Sidak-Test).

Zunächst wurde eine Analyse der Dichte der VGLUT2⁺-Synapsen durchgeführt (Abb. 5.3 B). Hier ergab sich zwar eine geringfügig verminderte Dichte von exzitatorischen Synapsen beiderseits bei den Sham-Ratten. Dieser Unterschied kann im Vergleich zur PT-Gruppe jedoch nicht als signifikant betrachtet werden ($p = 0,174$). Es ergab sich also weder innerhalb einer Gruppe (rechts vs. links) noch zwischen den Tiergruppen (PT vs. Sham) eine deutliche Differenz.

Hinsichtlich der absoluten Anzahl erregender Synapsen zeigte sich bei den PT-Ratten, dass das rechte Fazialiskerngebiet deutlich weniger VGLUT2⁺-Synapsen aufweist als auf der gesunden Seite (-24%, $p = 0,01$). Auch bei der Sham-Gruppe stellte sich hinsichtlich der Anzahl exzitatorischer Synapsen ein signifikanter Unterschied ein. So lag auch hier auf der lädierten Seite eine geringere Menge an VGLUT2⁺-Synapsen vor als im linken Kerngebiet (-

23%, $p = 0,05$). So kann zunächst festgestellt werden, dass die operierte Seite beider Gruppen signifikant weniger Synapsen enthält als die linken Fazialiskerngebiete und somit auf einen Effekt der FFA hindeutet.

Vergleicht man außerdem noch die beiden Gruppen miteinander, ist festzuhalten, dass beide Kerne der Sham-Tiere eine deutlich geringere Anzahl erregender Synapsen aufweist als die PT-Nager. Diese Differenz fällt signifikant aus (re.: -26,5%, $p = 0,029$; li.: -27%, $p = 0,004$). Demzufolge wirkt sich also nicht nur die Operation, sondern auch die Injektion des Farbstoffes bzw. die Photothrombose auf die Anzahl exzitatorischer Synapsen aus.

So kann zwar auch hier festgestellt werden, dass die Sham-Nager mit einer geringeren Anzahl exzitatorischer Synapsen ausgestattet sind. Dies bedingt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen bezüglich der VGLUT2⁺-Dichte, da die Sham-Tiere auch ein geringeres Kernvolumen beiderseits aufweisen als die PT-Ratten.

5.4 Verhältnis exzitatorischer zu inhibitorischen Synapsen

Die exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen liegen im Fazialiskerngebiet in einem bestimmten Verteilungsmuster vor. Das Verhältnis von VGLUT2⁺- zu VGAT⁺-Synapsen ist in folgender Abbildung dargestellt (Abb. 5.4):

Verhältnis exzitatorischer zu inhibitorischen Synapsen

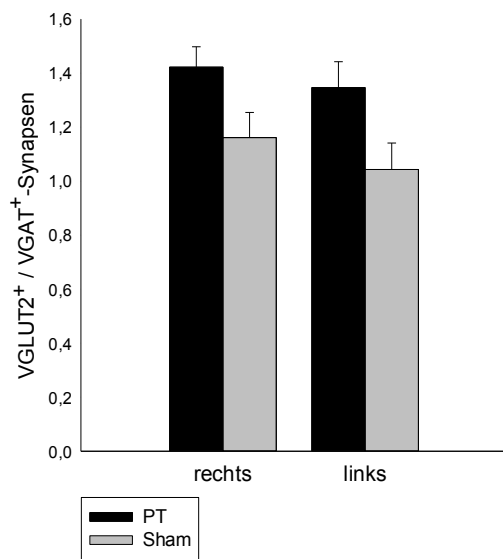


Abb. 5.4: Analyse des Verhältnisses von exzitatorischen (VGLUT2⁺) zu inhibitorischen (VGAT⁺) Synapsen im Fazialiskerngebiet der PT- und Sham-Tiere 8 Wochen nach der operativen Behandlung. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (ANOVA).

Zwar ergab sich, dass das Verteilungsverhältnis bei den PT-Tieren deutlich zugunsten der exzitatorischen Synapsen verschoben ist ($MW_{PTre} = 1,422$, $MW_{PTli} = 1,346$), jedoch stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Seiten ein ($p = 0,56$).

Bei der Kontrolltieren lag im rechten Ncl. facialis ein Verteilungsmuster vor, das auch leicht zugunsten der VGLUT2⁺-Synapsen verschoben ist ($MW_{Shamre} = 1,161$). Auf der kontralateralen Seite ist dieses Verhältnis allerdings annähernd ausgeglichen ($MW_{Shamli} = 1,043$). Im Seitenvergleich grenzten die Synapsenverhältnisse sich bei den Sham-Ratten hingegen nicht signifikant voneinander ab ($p = 0,599$).

Vergleicht man außerdem noch die beiden Gruppen miteinander, ist erkennbar, dass zwar die Sham-Tiere ein niedrigeres Verteilungsverhältnis der Synapsen aufweisen, diese Differenz zu den PT-Nagern aber nicht als signifikant zu werten ist ($p_{re} = 0,194$, $p_{li} = 0,123$).

Folglich beeinflusst weder die FFA noch die Injektion des Farbstoffes bzw. die Photothrombose maßgeblich das Verteilungsmuster der beiden Synapsentypen zueinander.

5.5 Motoneuronen und cholinerge Synapsen (ChAT⁺)

In einer weiteren Färbung wurden die Motoneurone und die cholinergen Synapsen dargestellt. Weitere Details zur Färbungstechnik lassen sich unter Punkt 4.4.3 nachlesen.

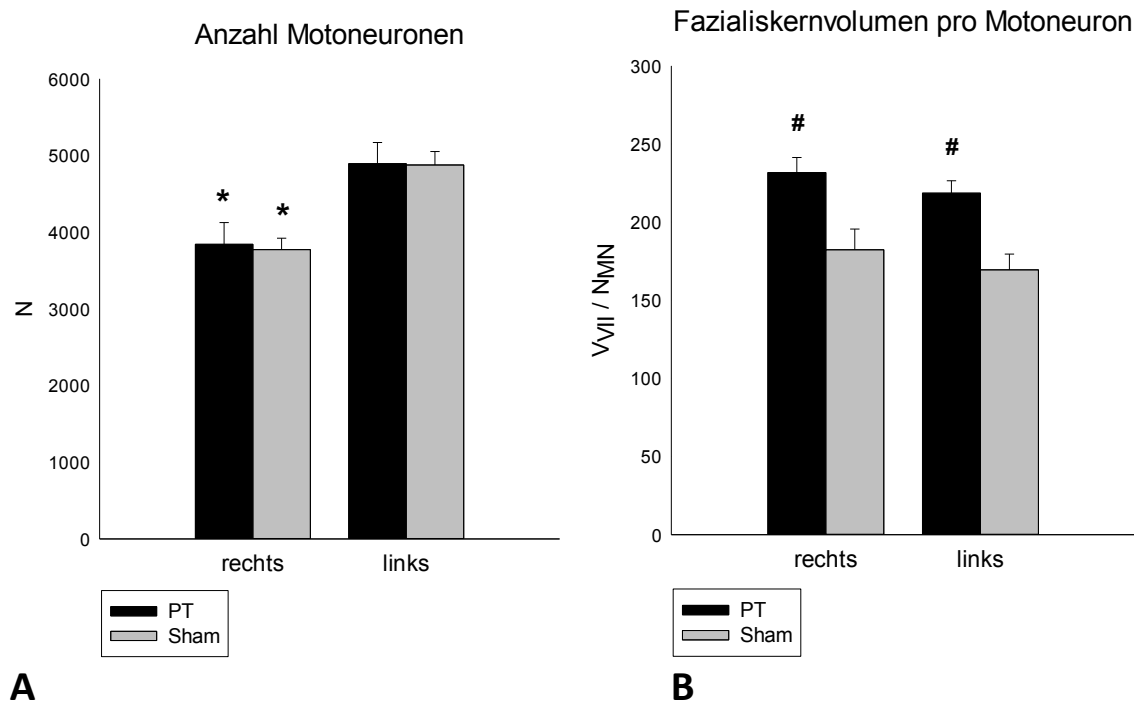


Abb. 5.5: Analyse der Motoneuronen.

Anzahl N (A) der Motoneurone sowie Fazialiskernvolumen V_{VII} pro Motoneuron MN (B) im Fazialiskerngebiet der PT- und Sham-Tiere. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur kontralateralen Seite (*) und zur Sham-Gruppe (#) (ANOVA gefolgt von Holm-Sidak-Test).

Bezüglich der absoluten Anzahl N der Motoneurone zeigte sich bei den PT-Ratten, dass das rechte Fazialiskerngebiet deutlich weniger dieser Zellen aufweist als die gesunde Seite (-21,5%, $p = 0,012$). Auch bei der Sham-Gruppe stellte sich hinsichtlich dieser Anzahl ein signifikanter Unterschied ein. So lag auch hier auf der lädierten Seite eine geringere Menge an Motoneuronen vor als im linken Kerngebiet (-22,6%, $p = 0,01$). So kann zunächst festgestellt werden, dass die operierte Seite beider Gruppen signifikant weniger Motoneuronen enthält als die linken Kerngebiete (Abb. 5.5 A).

Beim Vergleich der beiden Tiergruppen miteinander stellte sich heraus, dass hinsichtlich der Motoneuronenanzahl keine Differenz besteht - weder rechts- noch linksseitig.

Es kann also angenommen werden, dass die operative Durchtrennung des N. facialis sich auf die Anzahl der Motoneuronen auswirkt.

Weiterhin erfolgte noch eine Analyse des Fazialiskernvolumenanteils pro Motoneuron (Abb. 5.5 B).

Diesbezüglich ist festzuhalten, dass bei den PT-Tieren der Volumenanteil pro Neuron rechtsseitig etwas größer ist als auf der nicht operierten Seite. Jedoch ist dieser Unterschied nach dem Holm-Sidak-Test nicht als signifikant zu werten ($p = 0,617$). Bei den Sham-Ratten lässt sich das Gleiche feststellen: es besteht im rechten Kerngebiet ein geringfügig höherer Fazialisvolumenanteil pro Motoneuron. Doch auch diese Differenz ist nicht signifikant ($p = 0,393$).

Beim Vergleich miteinander sind die beiden Versuchstiergruppen allerdings different. Die Sham-Nager weisen beidseitig einen deutlich geringeren Volumenanteil auf als die PT-Ratten ($p_{re} = 0,012$, $p_{li} = 0,01$).

Desweiteren wurde eine Analyse der Motoneuronenfläche durchgeführt (Abb. 5.6 A). Hierfür wurden die Motoneuronenzellkörper vollständig umrandet, woraus sich einerseits der Umfang (Perimeter) wie auch die Fläche des Neurons bestimmen ließ.

Im gleichen Färbungsverfahren konnte auch die Häufigkeit der cholinergen (ChAT⁺) Synapsen, die an den Zellkörpern der Motoneuronen ansetzen, untersucht werden. Hier wurde das Aufkommen dieser Synapsen bestimmt (Abb. 5.6 B), indem zuerst die Anzahl pro Perimeter (Umfang eines Motoneurons) ermittelt wurde.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Motoneuronenfläche sowie die Häufigkeitsverteilung der ChAT⁺-Synapsen.

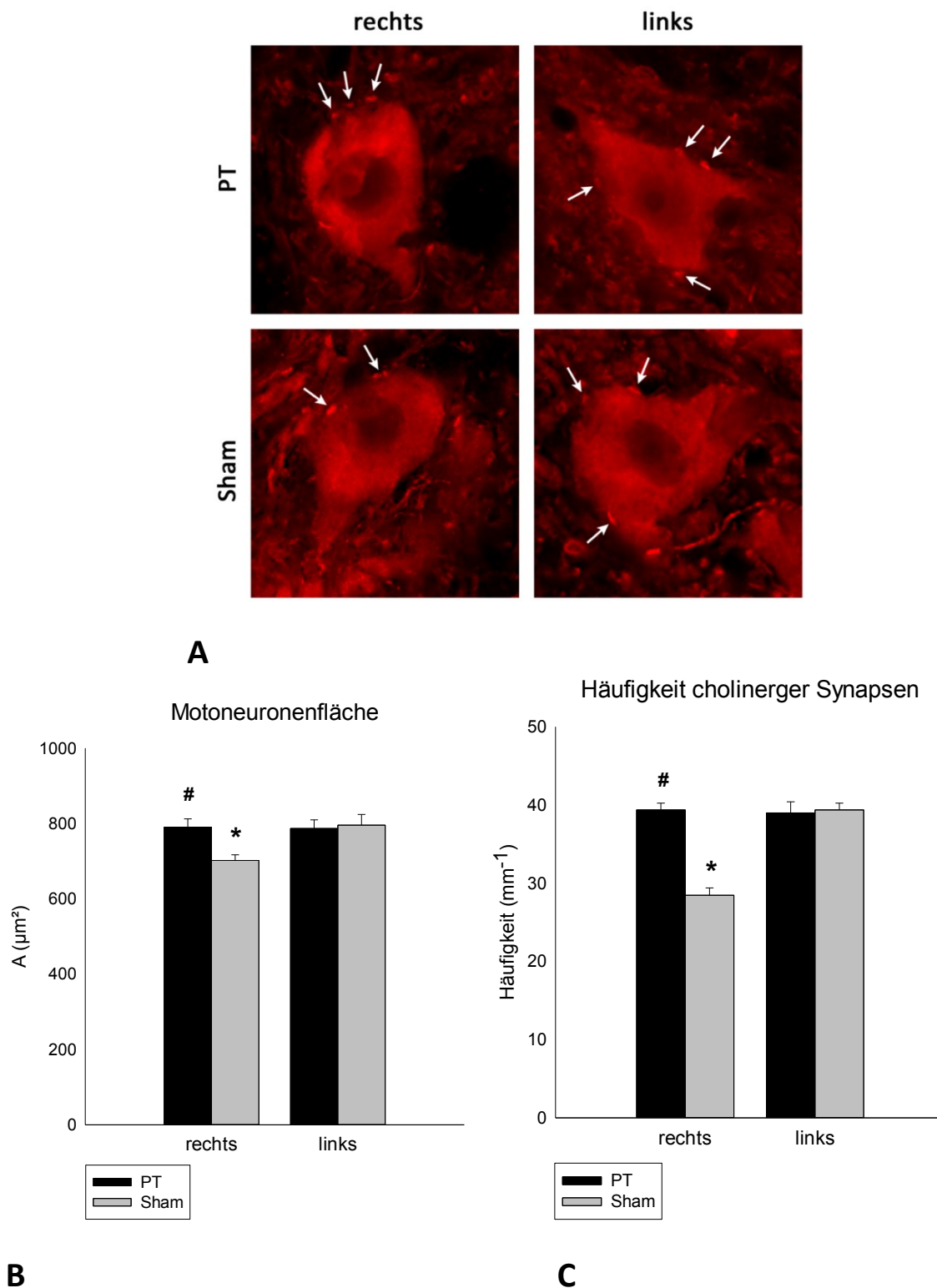


Abb. 5.6: Analyse der Motoneuronen und cholinergischer (ChAT⁺) Synapsen.

A) Darstellung von ChAT⁺-Motoneuronen in 40-facher Vergrößerung. Die Pfeile (↑) kennzeichnen ChAT⁺-Synapsen, die am Motoneuron ansetzen.

Fläche A (B) der Motoneurone und Häufigkeit der ChAT⁺-Synapsen (C) im Fazialiskerngebiet der PT- und Sham-Tiere 8 Wochen nach der operativen Behandlung. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur kontralateralen Seite (*) und Sham-Gruppe (#) (ANOVA gefolgt von Holm-Sidak-Test).

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Zellkörpergröße der Motoneuronen bei den PT-Nagern lässt sich festhalten, dass zwischen den Seiten keine signifikante Differenz besteht ($p = 0,919$). Die Motoneuronen des rechten Kernes haben bei den PT-Tieren demzufolge die gleiche Fläche wie auf der kontralateralen Seite. Bei den Sham-Ratten lässt sich dies jedoch nicht feststellen. Hier liegt die Motoneuronenfläche betreffend ein deutlicher Unterschied vor. Die Zellkörper sind bei den Sham-Tieren auf der lädierten Seite signifikant kleiner als auf der gesunden Seite (-11,8%, $p = 0,039$).

Zieht man nun wieder den Vergleich zwischen den beiden Versuchstiergruppen, ist auch hier ein Unterschied festzustellen. Dieser betrifft vor allem die rechten Fazialiskerngebiete. So zeigte sich bei den Sham-Ratten eine deutliche kleinere Zellkörpergröße als bei den PT-Tieren (-11,2%, $p = 0,049$).

Dies deutet darauf hin, dass die Kombination aus FFA und Injektion von Bengalrosa einen Einfluss auf die Motoneuronenfläche hat. Die alleinige Injektion des Farbstoffes scheint hingegen auf diesen Parameter kaum Auswirkungen zu haben, da linksseitig kein Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen ist.

Bezüglich der cholinergen Synapsen zeigte sich bei den PT-Tieren zunächst, dass beide Fazialiskerngebiete mit einer ähnlichen Häufigkeit an ChAT⁺ ausgestattet sind. Es bestehen innerhalb dieser Tiergruppe also keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten ($p_{PT} = 0,992$). Bei den Kontrolltieren war jedoch, verglichen mit der gesunden Seite, eine signifikant geringere Synapsendichte im rechten Ncl. facialis auffällig (-27,7%, $p < 0,001$).

Auch bei der Gegenüberstellung der beiden Gruppen zeigte sich ein Unterschied. So enthielt das rechte Kerngebiet der Sham-Tiere deutlich weniger ChAT⁺-Synapsen als die vergleichbare Seite der PT-Ratten (-27,7%, $p < 0,001$). Hingegen konnten beim Vergleich der kontralateralen Seite keine signifikanten Differenzen ausgemacht werden. Sowohl die PT- als auch die Sham-Ratten wiesen linksseitig eine ähnliche Häufigkeit von ChAT⁺ auf.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Ergebnis der ChAT⁺-Analyse gut mit dem der Motoneuronoberfläche vereinbar ist (Abb. 5.6A). Eine kleinere Oberfläche geht also entsprechend mit einer geringeren Häufigkeit von cholinergen Synapsen einher.

5.6 Funktionsanalyse des Nervus facialis

Die funktionelle Analyse erfolgte mit Hilfe von Videoaufnahmen der Vibrissenbewegungen. Die Videos wurden acht Wochen postoperativ aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Mira Finkensieper, HNO-Klinik, Jena (Details unter Punkt 4.3).

Die Auswertung der Filmdokumente zeigte, dass der Retraktionswinkel bei allen Tieren sowohl rechts wie auch links ähnlich groß war (Ergebnisse nicht gezeigt) (Angelov et al., 2007). Insgesamt ist bei beiden Tiergruppen auch der Protraktionswinkel rechtsseitig größer als bei der kontralateralen Seite. Logischerweise ergibt sich dadurch ein Unterschied bzgl. der Bewegungsamplitude im Seitenvergleich. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Amplituden sind in folgender Abbildung dargestellt:

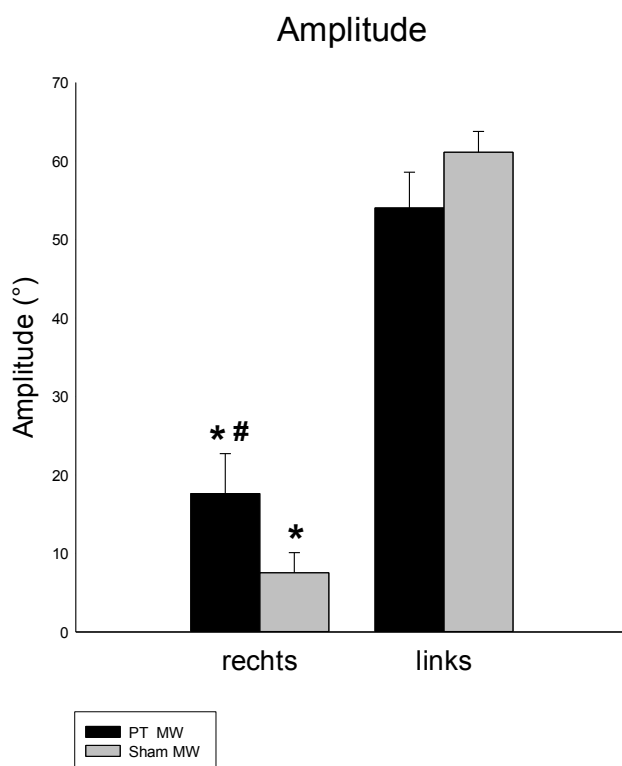


Abb. 5.7: Analyse der Amplitude der Vibrissenbewegung.

Die Amplitude (°) ergibt sich aus der Differenz zwischen maximaler Protraktion und Retraktion. Abgebildet sind Mittelwerte und SEM. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur kontralateralen Seite (*) und Sham-Gruppe (#) (ANOVA gefolgt von Holm-Sidak-Test).

Bezüglich der Amplitude zeigte sich bei den PT-Ratten, dass die lädierte Seite eine deutlich geringere Bewegungsspanne aufwies als die gesunde Seite (-67,4%, $p < 0,001$). Auch bei der

Sham-Gruppe stellte sich hinsichtlich dieser Anzahl ein signifikanter Unterschied ein. So lag auch hier auf der rechten Seite eine geringere Amplitude vor als linksseitig (-87,76%, $p < 0,001$). So kann zunächst festgestellt werden, dass die FFA-operierte Seite beider Gruppen ein signifikant geringeres Bewegungsausmaß vorwies als die intakte Seite.

Auch beim Vergleich der beiden Tiergruppen miteinander stellte sich ein signifikanter Unterschied ein. So konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die Bewegungsspanne rechts bei den Kontrollratten, die keine Photothrombose, jedoch eine Bengalrosa-Injektion erhielten, signifikant kleiner ausfiel als bei den PT-Tieren (-57,2%, $p = 0,042$). Die Bewegungsamplituden der linken Seiten fielen hingegen normal aus ($MW_{PT} = 54,0^\circ$; $MW_{Sham} = 61,1^\circ$) und unterschieden sich im Vergleich nicht signifikant voneinander ($p = 0,097$).

Ausgehend von den Ergebnissen der histologischen und funktionellen Untersuchungen konnte eine Korrelationsanalyse erstellt werden, die im Folgenden vorgestellt wird.

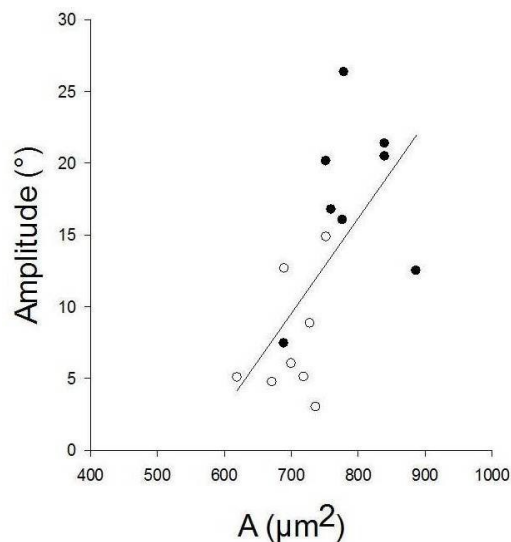
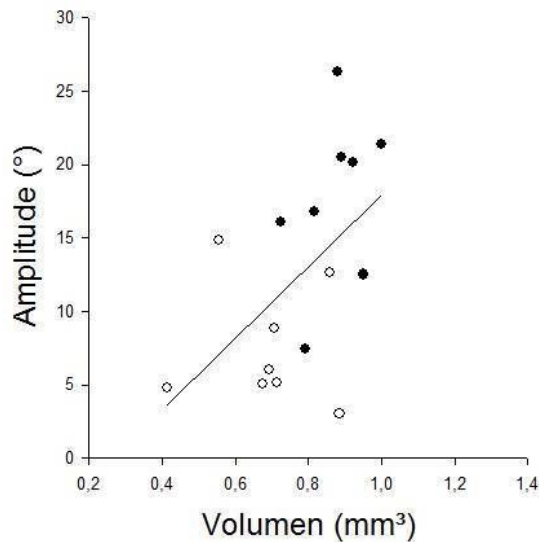
5.7 Korrelationsanalyse

Untersucht wurde, ob und wie ausgeprägt Korrelationen zwischen den Resultaten der Funktionsanalyse (Punkt 5.6) und der histologischen Auswertung (Punkte 5.1 bis 5.5) bestehen.

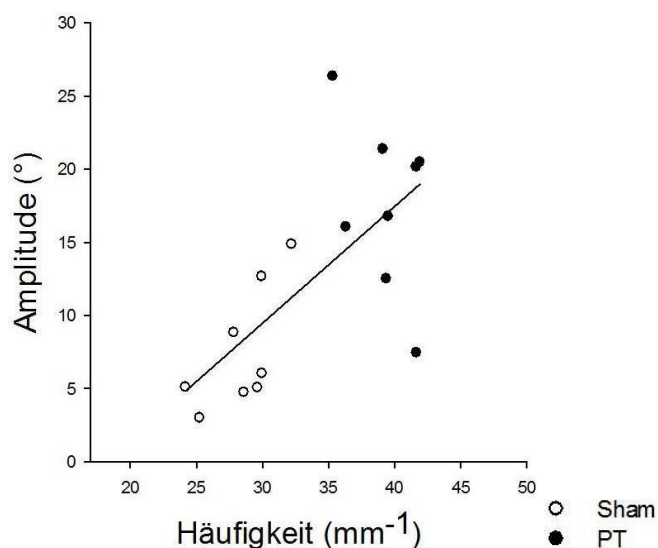
Zwischen der rechtsseitigen Amplitudenveränderung und dem Fazialiskernvolumen, der Häufigkeit cholinerg Synapsen sowie der Motoneuronenfläche besteht eine positive Korrelation (Abb. 5.8). Das bedeutet, dass ein höherer Wert dieser histologischen Parameter mit einer größeren Amplitude einherging. Dies konnte die Synapsen betreffend nicht festgestellt werden. Hier lag allenfalls ein sehr niedriger Korrelationskoeffizient vor (Abb. 5.8 A).

		Vol	VGAT N	VGAT Nv	VGLUT N	VGLUT Nv	VGLUT/ VGAT	MN N	Vol/ MN	ChAT	MN A
Ampli	ρ	0,56	0,23	-0,23	0,32	0,03	0,21	0,35	0,13	0,68	0,73
	p	0,025	0,390	0,348	0,215	0,908	0,436	0,182	0,632	0,004	0,001

A



B



C

D

Abb. 5.8: Korrelationsanalyse der funktionellen und histologischen Ergebnisse.

A) Tabellarische Darstellung der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ρ mit dazugehörigem p-Wert.

Desweiteren Darstellung der Korrelation zwischen der rechtsseitigen Amplitude (°) auf der y-Achse und dem Volumen (B), der Motoneuronenfläche (C) und der Häufigkeit cholinergischer Synapsen (D) auf der x-Achse. Leere Punkte zeigen den jeweiligen Zusammenhang bei den Sham-Tieren, schwarze Punkte bei den PT-Tieren.

Anhand der oben gezeigten Abbildungen (B) bis (D) ist deutlich zu erkennen, dass bei den PT-Tieren ein größeres Volumen (B), eine größere Motoneuronenfläche (C) und eine höhere Anzahl cholinergischer Synapsen (D) auch mit einer größeren Amplitude einhergeht (schwarze Punkte). Gleichzeitig liegen bei den Kontrollratten (weiße Punkte) die gleichen histologischen Merkmale in einer geringeren Ausprägung vor und sind mit einer verminderten Amplitude vergesellschaftet. Aufgrund dieser Korrelation ist davon auszugehen, dass die Differenzen zwischen den beiden Gruppen auf eine unterschiedliche Behandlung zurückzuführen sind.

6. Diskussion

Betrachtet man die funktionellen und histologischen Ergebnisse, so lassen sich zusammenfassend folgende Aussagen treffen:

- 1) Hinsichtlich der funktionellen Ergebnisse schnitten die Sham-operierten Nager mit einer deutlich reduzierten Amplitude auf der Läsionsseite signifikant schlechter ab als die PT-Tiere. Im Vergleich zur kontralateralen Seite wiesen die Photothrombose-Ratten jedoch auch eine geringere Amplitude auf.
- 2) Bei den Sham-Ratten ist im Vergleich zu den PT-Nagern eine Atrophie des Ncl. facialis auffällig, rechts ausgeprägter als links. Diese Atrophie zeigte sich auch auf der rechten Seite bei den PT-Tieren, jedoch nicht linksseitig.
- 3) Sowohl bei den PT- wie auch bei den Kontrolltieren stellte sich verglichen mit der linken Seite eine zahlenmäßige Verminderung von inhibitorischen wie exzitatorischen Synapsen auf der Seite der Läsion ein. Wie auch beim Volumen war diese Verminderung bei den Sham-Tieren auffälliger als bei den PT-Ratten.
- 4) Als signifikant war auch die geringere Anzahl von Motoneuronen einzustufen, die auf der ipsilateralen Seite bei beiden Tiergruppen ermittelt werden konnte.
- 5) Eine geringere Motoneuronenfläche wie auch eine verminderte Häufigkeit cholinergischer Synapsen zeigte sich hingegen nur auf der Läsionsseite bei den Kontrollratten.

Die hier angewandte Operationstechnik der Fazialis-Fazialis-Anastomose ist ein seit vielen Jahren genutztes Tiermodell zur Untersuchung von Degenerations- und Regenerationsprozessen nach Nervenläsion (Angelov et al., 2007). Dieser Eingriff wurde von Prof. Guntinas-Lichius und Dr. Irintchev durchgeführt, die die FFA schon häufig durchführten und sehr erfahrene Operateure sind.

Auch das hier zur Anwendung gekommene Hirninfarktmodell mittels photochemisch induzierter Thrombose ist ein 1985 entwickeltes Verfahren nach Watson et al. (1985). Aufgrund der geringen Invasivität, der einfachen Reproduktion sowie Modulierung von Infarktgröße und -lokalisation ist es ein seitdem gut etabliertes Modell in der Erforschung des ischämischen Schlaganfalls (Schmidt, 2006).

Die funktionelle Analyse mittels Videoaufnahmen ist ein seit über zehn Jahren genutztes und etabliertes Verfahren. Nach alleiniger FFA betrug die maximal erreichte Amplitude auf der Läsionsseite ca. 20° bei Tomov (2002). Nachfolgende Studien zur Fazialisregeneration durch Guntinas-Lichius et al. (2005) und Angelov et al. (2007) konnten dieses Ergebnis bestätigen. Die immunhistochemischen Techniken sowie die daran anschließenden stereologischen Analysen sind lange gebräuchlich und haben sich bewährt (Irintchev et al., 2005; Jakovcevski et al., 2009).

6.1 Funktionsdefizit nach Photothrombose und Farbstoffinjektion

Aus Studien von Angelov et al. (2007) und Tomov (2002) ging hervor, dass die durchschnittliche Bewegungsamplitude der Vibrissen bei intaktem N. facialis zwischen 50° und 60° liegt. Nach erfolgter Läsion des N. facialis kommt es regelhaft zu einer Verschlechterung der funktionellen Erholung mit einer maximalen Vibrissenamplitude von ca. 20° (Raslan et al., 2013; Tomov, 2002).

Die schlechte Erholung nach Axotomie ist verschiedenen Faktoren geschuldet, u.a. der fehlgeleiteten Reinnervation der Zielmuskeln (Guntinas-Lichius et al., 2005; Sumner, 1990) sowie des veränderten synaptischen Inputs auf Höhe der fazialen Motoneurone (Graeber et al., 1993; Raslan et al., 2013).

Mit der vorliegenden Studie konnte auch gezeigt werden, dass eine traumatische Läsion des N. facialis zu einem Funktionsdefizit der Vibrissenbeweglichkeit führt. Jedoch stellte sich überraschenderweise heraus, dass die funktionelle Erholung bei den Kontrolltieren mit einer durchschnittlichen Bewegungsamplitude von 8° deutlich schlechter ausfiel als bei den Photothrombose-Ratten auf der Läsionsseite ($MW_{\text{Amplitude}} = 18^\circ$). Dieses Ergebnis war in zweierlei Hinsicht unerwartet, da man davon ausging, dass die Ausschaltung des Barrel-Kortex als Struktur des supranukleär gelegenen Verschaltungskreises zu einer zusätzlichen Funktionsverschlechterung führt. So zeigte sich jedoch, dass die Sham-Tiere, die lediglich die Farbstoffinjektion erhielten, funktionell signifikant schlechter als die PT-Ratten und auch im Vergleich zu Literaturdaten von Tieren, bei denen eine FFA ohne Bengalrosa-Injektion erfolgte, abschnitten.

Unbenommen davon korreliert das Ausmaß der funktionellen Erholung zum Teil mit den histologischen Ergebnissen. So geht eine schlechte Funktion mit einem verminderten Volumen, einer reduzierten Motoneuronenfläche und einer geringeren Häufigkeit cholinерger Synapsen einher.

6.2 Atrophie des Nucleus n. facialis

Aus der Arbeit von Raslan et al. (2013) geht hervor, dass das Fazialiskernvolumen von Sham-operierten Tieren (lediglich Freilegung des Nervs ohne Durchtrennung) ein mittleres Volumen von 1 mm^3 aufweist. Die ermittelten Volumina der FFA-Tiere sanken hingegen mit zunehmendem Abstand vom Läsionszeitpunkt und erreichten ein signifikantes Niveau zwei Monate nach der Nervendurchtrennung.

Auch in der hier vorliegenden Studie konnte eine absolute Volumenreduktion der rechten Kerngebiete erfasst werden. Zudem zeigte sich, dass die rechten und die linken Kerne der Kontrolltiere insgesamt kleiner ausfielen als bei den vergleichbaren Seiten der PT-Ratten (rechts: -21,2%, links: -22,8%).

Eine mögliche Erklärung würde die Retraktion der motoneuralen Dendritenbäume liefern. Hierbei kommt es zunächst zu einer Schrumpfung nach Axotomie, die jedoch nach erfolgter Muskelreinnervation wieder rückläufig, aber nicht vollständig ist (Brannstrom et al., 1992) und somit eine anhaltende Kernatrophie nicht vollends begründen kann.

Die o.g. Ergebnisse lassen sich auch allenfalls nur teilweise durch den numerischen Verlust von Motoneuronen der rechten Fazialiskerngebiete beider Tiergruppen erklären. Bereits Heckroth (1994) zeigte durch histologische Auswertungen von zerebellären Kernregionen, dass Somata und Dendriten lediglich 19% des Gesamtvolumens ausmachen. Den deutlich höheren Volumenanteil wird mit ca. 50% von Axonen, axosomatischen und axodendritischen Terminalen eingenommen (Heckroth, 1994). Dies spiegelt sich auch in den hier vorliegenden Ergebnissen wider. So geht ein reduziertes Kernvolumen sowohl bei den PT- als auch bei den Kontrolltieren mit einer verminderten Anzahl inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen (z.B. rechte Kernvolumina von PT = $0,87 \text{ mm}^3$ und KG = $0,69 \text{ mm}^3$ mit VGLUT2⁺ + VGAT⁺ mit $19,9 \times 10^6$ gegenüber $15,9 \times 10^6$, ein ähnlicher Zusammenhang zeigte sich auch im Vergleich der linken Kerne) einher. Die Verminderung von Synapsen

resultiert auch in einer Abnahme axonaler Endigungen (Vanderhaeghen & Cheng, 2010), sodass die hier beobachtete Kernatrophie durch die nukleäre Deafferenzierung erklärt werden kann.

Hinsichtlich der funktionellen Erholung ließ sich mit Hilfe der Korrelationsanalyse ein Zusammenhang zwischen den verminderten Kernvolumina und der verminderten Vibrissenamplitude herstellen. Jedoch ist, wie bereits erwähnt, die Kernatrophie möglicherweise überwiegend das Resultat nukleärer Deafferenzierung, sodass man davon ausgehen kann, dass es indirekt eine Korrelation zur verminderten Synapsenanzahl gibt. Ein solcher direkter Zusammenhang ist in der Arbeit von Raslan et al. (2013) bezüglich exzitatorischer und cholinergischer Terminale bereits belegt.

6.3 Deafferenzierung des Nucleus facialis

Im Rahmen der Untersuchungen zeigte sich bei beiden Tiergruppen eine signifikante Reduktion afferenter Synapsen (VGAT⁺ und VGLUT2⁺) in den Kernen der Läsionsseite. Dass es nach FFA zu einem Verlust von synaptischen Terminalen kommt, ist u.a. durch Untersuchungen von Raslan et al. (2013) belegt. Dieser Verlust von Afferenzen lässt sich durch das „synaptische Stripping“, welches nach Axotomie beobachtet wurde, erklären (Graeber et al., 1993; Yamada et al., 2011). Bei diesem Vorgang schieben sich Mikroglia und Astrozyten, die infolge der Nervendurchtrennung in das Kerngebiet eingewandert sind, zwischen die synaptischen Terminale und die Motoneuronenoberfläche (Blinzinger & Kreutzberg, 1968; Guntinas-Lichius & Angelov, 2008). Der Verlust von Synapsen steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Stoffwechselumstellung, die das Motoneuron nach Axotomie durchläuft. Durch diese Umstellung von einem Transmitter- in einen Wachstums-orientierten Modus wird auch die Synthese sogenannter Synapsenadhäsionsmoleküle (SynCAM1, NLG-2, -3, NGL-2) herunterreguliert. Diese sind nicht nur an der Bildung von synaptischen Verbindungen beteiligt, sondern sichern auch deren strukturelle Integrität (Berg et al., 2013).

Zudem zeigte sich bei den Kontrolltieren eine geringgradige Verschiebung des Synapsenverhältnisses in Richtung Inhibition verglichen mit den PT-Tieren. In der Arbeit von

Raslan et al. (2013) war diese Verschiebung deutlich ausgeprägter. Bezüglich der Exzitation ist erwiesen, dass die Expression von AMPA-, NMDA- und metabotropen Glutamatrezeptoren nach Fazialisläsion abnimmt (Eleore et al., 2005). Die in der Studie von Raslan et al. (2013) sowie die auch hier vorliegende Reduktion glutamaterger Synapsen nach FFA lassen sich mit dem Verlust postsynaptischer Rezeptoren assoziieren (Vanderhaeghen & Cheng, 2010). Und obwohl es zu einer kompensatorischen Erhöhung der Expression postsynaptischer Glutamatrezeptoren kommt (Eleore et al., 2005) bleibt die Anzahl von VGLUT2⁺-Synapsen auch nach maximaler funktioneller Erholung reduziert. Daher lässt sich annehmen, dass der reduzierte exzitatorische Input zu einer verminderten Motoneuronenaktivität und somit einer eingeschränkten Kontraktionsfähigkeit der Muskulatur führt, welche das funktionelle Defizit mit bedingt (Angelov et al., 2005; Guntinas-Lichius, Hundeshagen, et al., 2007).

Die inhibitorischen Synapsen sind ebenso erwiesenermaßen nach Nervenläsion in ihrer Anzahl rückläufig, jedoch scheint dieser Verlust nicht so ausgeprägt zu sein wie bei den VGLUT2⁺-Terminalen. Es kommt sogar zu einer Erholung der Anzahl GABAerger Synapsen (Raslan et al., 2013).

Es wird angenommen, dass der Vorgang der Deafferenzierung einen Schutzmechanismus darstellt, der die Exzitotoxizität durch eine übermäßige afferente Stimulation verhindern soll. Man vermutet außerdem, dass der afferente Input, nach erfolgter Regeneration, wiederhergestellt wird, um eine adäquate Motoneuronenaktivität zu ermöglichen (Moran & Graeber, 2004; Navarro et al., 2007).

Auch bei der Häufigkeit cholinergischer Synapsen zeigte sich eine signifikante Verminderung. Dies betraf allerdings lediglich die lädierte Seite der Sham-Gruppe.

ChAT⁺-Synapsen, die vor allem perisomatisch und an den proximalen Dendriten ausgebildet sind, sind mit postsynaptischen M2-Muskarinrezeptoren assoziiert (Hellstrom et al., 2003). Deren Aktivierung führt über eine gesteigerte Erregbarkeit der Neurone mit Anstieg der Aktionspotentialfrequenz zu einer Modulation der Motoneuronenaktivität. Durch die Beeinflussung der Frequenz, mit der die Motoneuronen feuern, wird ein effizienter Motoneuronenoutput sichergestellt mit daraus resultierender koordinierter Muskelkontraktionen (Miles et al., 2007).

In einer Arbeit von Hoover et al. (1996) konnte gezeigt werden, dass die Muskarin-Rezeptoren bereits eine Woche nach Läsion um die Hälfte abnahm und auch keine vermehrte Bildung von Muskarinrezeptor-mRNA nachgewiesen werden konnte. Somit wurde davon ausgegangen, dass eine Läsion des N. facialis zur Transkriptionshemmung und somit zu einer verminderten Rezeptorexpression führt. Zu diesem Sachverhalt passend zeigte sich bei Raslan et al. (2013) zwei Monate nach FFA eine signifikante Reduktion von cholinergen Synapsen. Demzufolge muss der Verlust von ChAT⁺-Synapsen mit einer eingeschränkten Motoneuronenmodulation und folglich eingeschränkter Koordination der Muskelkontraktion einhergehen. Und so kann auch in der hier vorliegenden Arbeit zumindest in der Sham-Tiergruppe die Korrelation zwischen verminderter ChAT⁺-Häufigkeit und schlechterem funktionellen Outcome hergestellt werden. Bei den PT-Tieren, die ebenso auf der Läsionsseite ein funktionelles Defizit aufwiesen, zeigte sich dieser Zusammenhang jedoch nicht.

Demzufolge scheint das Zusammenwirken verschiedener histomorphologischer Umbauvorgänge am funktionellen Outcome beteiligt zu sein.

6.4 Verlust und Atrophie von Motoneuronen

Aus einer Arbeit von Hundeshagen et al. (2013) ging hervor, dass die durchschnittliche Motoneuronenanzahl im Fazialiskerngebiet bei den intakten, nicht-operierten Ratten 4582 ± 410 betrug. Eine ähnliche Anzahl ließ sich bei den intakten Kernseiten beider Versuchstiergruppen ermitteln. Auf der lädierten Seite zeigte sich jedoch sowohl bei den PT- als auch bei den Sham-Tieren eine signifikant reduzierte Anzahl von Motoneuronen ($PT_{re} = 3841 \pm 283$, $Sham_{re} = 3772 \pm 148$). Somit lässt sich ein Verlust an Nervenzellen nach Axotomie feststellen.

Ob und wie ausgeprägt jedoch der Verlust an Nervenzellen ist, hängt neben der Schwere auch von der Höhe der Läsion, der Neuronenart und dem Alter des Individuums ab (Fu & Gordon, 1997; Navarro et al., 2007). Neonatale Neurone sind deutlich anfälliger abzusterven als jene von erwachsenen Individuen (Snider et al., 1992). Auch Umemiya et al. (1993) zeigten, dass die nervale Transektion zu einen Verlust von ca. 80% der Motoneurone bei

neonatalen Ratten führte. Und selbst eine weniger traumatische Läsion (Quetschung) resultierte in einem signifikanten Verlust an motorischen Zellen bei den Neonaten im Gegensatz zu adulten Ratten (Soreide, 1981). Bezüglich der Läsionshöhe konnte gezeigt werden, dass weiter proximal gelegene Traumen zu einem ausgeprägten Verlust von Neuronen führte als distale (Mattsson et al., 1999).

In der hier vorliegenden Untersuchung kann jedoch weder von neonatalen Ratten noch von einer weit proximal gelegenen Läsion die Rede sein. Auch steht der hier ermittelte Verlust im Widerspruch zu einer Arbeit von Guntinas-Lichius et al. (1994), wonach bei adulten Ratten nach FFA keine Reduktion der Motoneuronenzahl festgestellt werden konnte. Erst eine Resektion des N. facialis führte zur Abnahme der Zellzahl.

So kann vermutet werden, dass der Verlust von Motoneuronen auf den Einfluss des Farbstoffes zurückzuführen ist. Bekannt ist, dass die Belichtung eines umschriebenen Kortexareals nach erfolgter Bengalrosa-Injektion zu einer Bildung von freien Radikalen führt mit Schädigung des umgebenden Endothels. Dies resultiert über Plättchenaggregation in einer lokalen Thrombosierung der kortikalen Gefäße (Macrae, 2011). Zudem weiß man, dass es im Bereich des Infarkts zur ausgeprägten Schädigung der mikrozirkulären Strombahn, zu einer Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke und zu einem frühen vasogenen Ödem führt (Ginsberg & Busto, 1989; A. Schmidt et al., 2012). Welchen Einfluss jedoch eine isolierte Bengalrosa-Injektion ohne nachfolgende Belichtung hat, ist bisher nicht untersucht worden. Die vorliegenden Befunde deuten auf toxische Effekte ausschließlich auf der operierten Seite hin. Es kann vermutet werden, dass Bengalrosa auch ohne Belichtung freie Radikale in kleinen Mengen produziert und damit schädlich auf axotomierte, besonders empfindlichen aber nicht auf intakte Motoneurone wirkt.

Außerdem zeigte sich hinsichtlich der Motoneuronenfläche eine signifikante Reduktion bei den Kontrolltieren auf der geschädigten Seite. Bei den PT-Ratten und auf der gesunden Seite der Sham-Gruppe stellte sich keine Flächenverminderung ein. Nach isolierter FFA zeigte sich hingegen keine Atrophie von Motoneuronen (Raslan et al., 2013). Die verminderte Zellfläche korreliert außerdem mit dem funktionellen Outcome der Tiere, was auf eine verminderte Motoneuronenfunktionalität hindeutet. Es kann vermutet werden, dass der reduzierte afferente Input mit folglich reduzierter Motoneuronenfunktion die Zellschrumpfung begünstigt.

Diese Untersuchung kann die Frage, worauf die Verbesserung der Funktion bei PT-im Gegensatz zur Sham-Behandlung beruht, nichtbeantworten. Es kann vermutet werden, dass die Läsion des somatosensorischen Kortex zur „Enthemmung“ von subkortikalen Strukturen führt. Der sensorische Vibrissen-Kortex hat direkte Projektionen zu trigeminalen sensorischen Arealen und filtert dort die Inputs aus den Vibrissen mittels intersubnukleärer hemmenden Projektionen (Furuta et al., 2008). Die Zerstörung des Barrel-Kortex würde das „Gating“ des sensorischen Inputs im Hirnstamm ausschalten und damit einen erhöhten Informationsfluss zum Fazialiskern ermöglichen. Da das funktionelle Outcome nach FFA vom Ausmaß der sensorischen Integrität abhängig ist (Tomov et al., 2008), ist zu erwarten, dass eine Verstärkung des sensorischen Inputs aus den trigeminalen Kernen positive Auswirkungen haben kann. Damit könnte man die geringere Deafferenzierung und geringere Atrophie der Motoneurone, sowie die bessere Funktion nach PT- versus Sham-Behandlung erklären.

6.5 Schlussfolgerungen

Hinsichtlich der unter Punkt 3 formulierten Ziele der Arbeit lassen sich nun folgende Aussagen treffen:

- 1) Die Photothrombose scheint im Vergleich zu den Sham-Tieren eine Verbesserung der Vibrissenbeweglichkeit nach FFA und Bengalrosa-Injektion zu bedingen. Letztendlich führt dies dazu, dass die PT-Tiere eine ähnlich gute funktionelle Erholung zeigten wie Tiere, die ausschließlich eine Fazialisnervläsion erhielten.
- 2) Jedoch zeigte sich bei der Kontrollgruppe, dass die Injektion von Bengalrosa im Vergleich zur alleinigen Fazialisläsion zu einer signifikant schlechteren Funktion führte.
- 3) Funktionelle Unterschiede korrelieren mit morphologischen Veränderungen. Die deutlich verminderten Kernvolumina und der reduzierte synaptische Input bei den Sham-Tieren gingen mit einer im Vergleich zu den PT-Tieren schlechteren Vibrissenbeweglichkeit einher.

Aus der Zusammenschau dieser Punkte kann vermutet werden, dass die vorliegenden Resultate auf einen neurotoxischen Effekt des Farbstoffes Bengalrosa zurückzuführen sind. Die zu vermutende Neurotoxizität trat jedoch nur in Zusammenhang mit der Fazialisläsion auf der rechten Seite auf. Dies zeigt sich v.a. bei den Kontrolltieren, die mit einer signifikant verminderten Motoneuronenanzahl und –fläche auf der Läsionsseite auffielen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Farbstoffeffekte auch bei den PT-Tieren auftraten. Denn auch hier kam es auf der rechten Kernseite zu einer Reduktion der Motoneuronenanzahl, was ebenso wie bei den Sham-Ratten auf eine toxische Komponente von Bengalrosa hinweisen könnte. Trotzdem zeigte sich eine bessere Erholung der Vibrissenamplitude. Das deutet darauf hin, dass supranukleär gelegene Areale des ZNS die Regeneration der Fazialisneurone beeinflussen.

Hinweise auf Neurotoxizität zeigten sich in anderen Studien, die den Farbstoff verwendeten bisher nicht. Das hier angewandte Hirninfarktmodell mittels photochemisch induzierter Thrombose ist ein 1985 entwickeltes Verfahren nach Watson et al. und ein seit dem bewährtes Modell in der Erforschung des ischämischen Schlaganfalls (A. Schmidt et al., 2012).

Mit den hier gezeigten Resultaten der Kontrollgruppe nach Bengalrosa-Injektion ist es jedoch empfehlenswert, das Studiendesign in seinem Aufbau und seiner Durchführung zu überprüfen und ggf. zu optimieren. Beispielsweise könnte man anstelle von einer mit Bengalrosa-bedingten Photothrombose, den Barrel-Kortex durch Kälteapplikation irreversibel schädigen und somit neurotoxische Effekte durch den o.g. Farbstoff ausschließen.

Aufgrund der Auswirkungen des Bengalrosa-Farbstoffes kann eine endgültige Aussage über mögliche Effekte der Photothrombose nicht getroffen werden. Somit bleibt die Frage, inwieweit sich die Unterbrechung supranukleär gelegener Strukturen auf die Regeneration und die funktionelle Erholung nach Fazialisläsion auswirkt, Gegenstand weiterer Untersuchungen.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Angelov, D. N., Ceynowa, M., Guntinas-Lichius, O., Streppel, M., Grosheva, M., Kiryakova, S. I., . . . Dunlop, S. A. (2007). Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis*, 26(1), 229-242. doi: 10.1016/j.nbd.2006.12.016
- Angelov, D. N., Guntinas-Lichius, O., Wewetzer, K., Neiss, W. F., & Streppel, M. (2005). Axonal branching and recovery of coordinated muscle activity after transection of the facial nerve in adult rats. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 180, 1-130.
- Berg, A., Zelano, J., Thams, S., & Cullheim, S. (2013). The extent of synaptic stripping of motoneurons after axotomy is not correlated to activation of surrounding glia or downregulation of postsynaptic adhesion molecules. *PLoS One*, 8(3), e59647. doi: 10.1371/journal.pone.0059647
- Berghaus, A., Rettinger, G., & Böhme, G. . (1996). Duale Reihe. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*.
- Blinzinger, K., & Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 85(2), 145-157.
- Brannstrom, T., Havton, L., & Kellerth, J. O. (1992). Changes in size and dendritic arborization patterns of adult cat spinal alpha-motoneurons following permanent axotomy. *J Comp Neurol*, 318(4), 439-451. doi: 10.1002/cne.903180408
- Chen, Z. L., Yu, W. M., & Strickland, S. (2007). Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*, 30, 209-233. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094337
- Choi, D., & Dunn, L. T. (2001). Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien)*, 143(2), 107-114.
- Dorfl, J. (1985). The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat*, 142, 173-184.
- Eberle, S. (2011). Vergleich der Bildqualität von hochauflösenden Felsenbein-Aufnahmen mit unterschiedlichen CT-Untersuchungstechniken.
- Eleore, L., Vassias, I., Vidal, P. P., & de Waele, C. (2005). Modulation of the glutamatergic receptors (AMPA and NMDA) and of glutamate vesicular transporter 2 in the rat facial nucleus after axotomy. *Neuroscience*, 136(1), 147-160. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.026

- Fawcett, J. W., & Keynes, R. J. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*, 13, 43-60. doi: 10.1146/annurev.ne.13.030190.000355
- Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C. C., Poulet, J. F., Staiger, J. F., . . . Schwarz, C. (2013). Barrel cortex function. *Prog Neurobiol*, 103, 3-27. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.11.002
- Fenrich, K., & Gordon, T. (2004). Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *Can J Neurol Sci*, 31(2), 142-156.
- Finkensieper, M., Volk, G. F., & Guntinas-Lichius, O. (2012). Facial nerve disorders. *Laryngorhinootologie*, 91(2), 121-141; quiz 142. doi: 10.1055/s-0031-1300965
- Fu, S. Y., & Gordon, T. (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 14(1-2), 67-116. doi: 10.1007/BF02740621
- Furuta, T., Timofeeva, E., Nakamura, K., Okamoto-Furuta, K., Togo, M., Kaneko, T., & Deschenes, M. (2008). Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *J Neurosci*, 28(8), 1789-1797. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4627-07.2008
- Ginsberg, M. D., & Busto, R. (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20(12), 1627-1642.
- Graeber, M. B., Bise, K., & Mehraein, P. (1993). Synaptic stripping in the human facial nucleus. *Acta Neuropathol*.
- Grosheva, M., Beutner, D., Volk, G. F., Wittekindt, C., & Guntinas-Lichius, O. (2010). [Idiopathic facial palsy]. *HNO*, 58(5), 419-425. doi: 10.1007/s00106-010-2099-5
- Guntinas-Lichius, O. (2007). Rehabilitation options for lesions of the facial nerve. *HNO*, 55(8), 605-612. doi: 10.1007/s00106-007-1587-8
- Guntinas-Lichius, O., & Angelov, D. N. (2008). [Experimental studies for the improvement of facial nerve regeneration]. *HNO*, 56(2), 122-130. doi: 10.1007/s00106-007-1610-0
- Guntinas-Lichius, O., Hundeshagen, G., Paling, T., & Angelov, D. N. (2007). Impact of different types of facial nerve reconstruction on the recovery of motor function: an experimental study in adult rats. *Neurosurgery*, 61(6), 1276-1283; discussion 1283-1275. doi: 10.1227/01.neu.0000280142.14292.5f
- Guntinas-Lichius, O., Irintchev, A., Streppel, M., Lenzen, M., Grosheva, M., Wewetzer, K., . . . Angelov, D. N. (2005). Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in

- the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci*, 21(2), 391-402. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03877.x
- Guntinas-Lichius, O., Neiss, W. F., Gunkel, A., & Stennert, E. (1994). Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 251(7), 410-417.
- Guntinas-Lichius, O., & Sittel, C. (2004). Diagnostics of diseases and the function of the facial nerve. *HNO*, 52(12), 1115-1130; quiz 1131-1112. doi: 10.1007/s00106-004-1143-8
- Guntinas-Lichius, O., Straesser, A., & Streppel, M. (2007). Quality of life after facial nerve repair. *Laryngoscope*.
- Hall, S. (2005). The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br*, 87(10), 1309-1319. doi: 10.1302/0301-620x.87b10
- Heckroth, J. A. (1994). A quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. II. Volumetric changes in cytological components. *J Comp Neurol*, 343(1), 183-192. doi: 10.1002/cne.903430114
- Hellstrom, J., Oliveira, A. L., Meister, B., & Cullheim, S. (2003). Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol*, 460(4), 476-486. doi: 10.1002/cne.10648
- Hoover, D. B., Baisden, R. H., & Lewis, J. V. (1996). Axotomy-induced loss of m2 muscarinic receptor mRNA in the rat facial motor nucleus precedes a decrease in concentration of muscarinic receptors. *Histochem J*, 28(11), 771-778.
- Howard, C. V., & Reed, M. G. (1998). Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy. *Bios Scientific Publishers*.
- Hundeshagen, G., Szameit, K., Thieme, H., Finkensieper, M., Angelov, D. N., Guntinas-Lichius, O., & Irintchev, A. (2013). Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. *Neuroscience*, 248C, 307-318. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.019
- Irintchev, A., Angelov, D. N., & Guntinas-Lichius, O. (2010). Regeneration of the facial nerve in comparison to other peripheral nerves : from bench to bedside. *HNO*, 58(5), 426-432. doi: 10.1007/s00106-010-2100-3

- Irintchev, A., Rollenhagen, A., Troncoso, E., Kiss, J. Z., & Schachner, M. (2005). Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex*, 15(7), 950-962. doi: 10.1093/cercor/bhh195
- Jackler, R.K., & Brackmann, D. (2004). Neurotology. *Elsevier Mosby*.
- Jakovcevski, I., Siering, J., Hargus, G., Karl, N., Hoelters, L., Djogo, N., . . . Irintchev, A. (2009). Close homologue of adhesion molecule L1 promotes survival of Purkinje and granule cells and granule cell migration during murine cerebellar development. *J Comp Neurol*, 513(5), 496-510. doi: 10.1002/cne.21981
- Lippert, H. (2003). Lehrbuch Anatomie. *Urban & Fischer Verlag München, Jena*.
- Macrae, I. M. (2011). Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1062-1078. doi: 10.1111/bph.2011.164.issue-4
- Masuhr, K.F., & Neumann, M. (2005). Duale Reihe. Neurologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*.
- Mattsson, P., Meijer, B., & Svensson, M. (1999). Extensive neuronal cell death following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *Brain Res Bull*, 49(5), 333-341.
- Miles, G. B., Hartley, R., Todd, A. J., & Brownstone, R. M. (2007). Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7), 2448-2453. doi: 10.1073/pnas.0611134104
- Moran, L. B., & Graeber, M. B. (2004). The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev*, 44(2-3), 154-178. doi: 10.1016/j.brainresrev.2003.11.004
- Mumenthaler, M., & Mattle, H. (2002). Grundkurs Neurologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*.
- Navarro, X., Vivo, M., & Valero-Cabre, A. (2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82(4), 163-201. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.06.005
- Pavlov, S. P., Grosheva, M., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O., Irintchev, A., Skouras, E., . . . Angelov, D. N. (2008). Manually-stimulated recovery of motor function after facial nerve injury requires intact sensory input. *Exp Neurol*, 211(1), 292-300. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.02.019

- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Elsevier Academic Press*.
- Raivich, G., & Makwana, M. (2007). The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Res Rev*, 53(2), 287-311. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.09.005
- Raslan, A., Ernst, P., Werle, M., Thieme, H., Szameit, K., Finkensieper, M., . . . Irintchev, A. (2013). Reduced cholinergic and glutamatergic synaptic input to regenerated motoneurons after facial nerve repair in rats: potential implications for recovery of motor function. *Brain Struct Funct*. doi: 10.1007/s00429-013-0542-6
- Sahni, V., Qi, Y., & Frostick, S. (2005). Peripheral nerve regeneration. *European Surgery*, 37(4), 187-192. doi: 10.1007/s10353-005-0173-0
- Schmidt, A.; , Hoppen, M.; , Strecker, JK.; , Diederich, K.; , Schäbitz, WR.; , Schilling, M.; , & Minnerup, J. (2012). Photochemically induced stroke in rats. *Experimental & Translational Stroke Medicine*.
- Schmidt, S. (2006). Auswirkungen des Lebensalters auf die kortikale funktionale Inhibition nach fokalen ischämischen Läsionen - elektrophysiologische und immunhistochemische Untersuchungen an der Ratte.
- Schünke, M.;, Schulte, E.;, & Schumacher, U. (2005). Prometheus LernAtlas der Anatomie: Kopf & Neuroanatomie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*.
- Seddon, H. J. (1942). A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J*, 2(4260), 237-239.
- Snider, W. D., Elliott, J. L., & Yan, Q. (1992). Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol*, 23(9), 1231-1246. doi: 10.1002/neu.480230913
- Soreide, A. J. (1981). Variations in the axon reaction in animals of different ages. A light microscopic study on the facial nucleus of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 110(1), 40-47.
- Sumner, A. J. (1990). Aberrant reinnervation. *Muscle Nerve*, 13(9), 801-803. doi: 10.1002/mus.880130905
- Sunderland, S. (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 491-516.
- Sunderland, S. (1990). The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*, 13(9), 771-784. doi: 10.1002/mus.880130903

- Tomov, T. (2002). An Example of Neural Plasticity Evoked by Putative Behavioral Demand and Early Use of Vibrissal Hairs after Facial Nerve Transection. *Experimental Neurology*, 178(2), 207-218. doi: 10.1006/exnr.2002.8040
- Trepel, M. (2003). Neuroanatomie. Struktur und Funktion. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München*.
- Umekiya, M., Araki, I., & Kuno, M. (1993). Electrophysiological properties of axotomized facial motoneurons that are destined to die in neonatal rats. *J Physiol*, 462, 661-678.
- Vanderhaeghen, P., & Cheng, H. J. (2010). Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6), a001859. doi: 10.1101/cshperspect.a001859
- Volk, G. F., Pantel, M., & Guntinas-Lichius, O. (2010). Modern concepts in facial nerve reconstruction. *Head Face Med*, 6, 25. doi: 10.1186/1746-160X-6-25
- Watson, B.D. , Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S., & Ginsberg, M.D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 497-504.
- Woolsey, T. A. (2003). Barrel Cortex.
- Woolsey, T. A., & Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res*, 17(2), 205-242.
- Yamada, J., Nakanishi, H., & Jinno, S. (2011). Differential involvement of perineuronal astrocytes and microglia in synaptic stripping after hypoglossal axotomy. *Neuroscience*, 182, 1-10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.030

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1	Anatomische Darstellung des extratemporalen Verlaufs des N. facialis mit Kennzeichnung der Läsionshöhe bei FFA, übernommen aus Guntinas-Lichius et al. (2005)	S. 23
Abb. 4.2	T1-gewichtetes MRT des Hirnes eines PT-Tieres (Dr. Mira Finkensieper)	S. 25
Abb. 4.3	Darstellung der standardisierten Anordnung der Querschnitte (Dr. Andrey Irintchev)	S. 28
Abb. 4.4	Optical-Disector-Methode für die stereologische Analyse am Mikroskop (Judit Kiesler)	S. 32
Abb. 5.1	Volumenanalyse des Fazialiskerngebiets (J. Kiesler)	S. 37-38
Abb. 5.2	Analyse inhibitorischer (VGAT ⁺) Synapsen des Fazialiskerngebiets (J. Kiesler)	S. 39-40
Abb. 5.3	Analyse exzitatorischer (VGLUT2 ⁺) Synapsen des Fazialiskerngebiets (J. Kiesler)	S. 41-42
Abb. 5.4	Analyse des Verhältnisses von exzitatorischen (VGLUT2 ⁺) zu inhibitorischen (VGAT ⁺) Synapsen im Fazialiskerngebiet (J. Kiesler)	S. 44
Abb. 5.5	Analyse der Anzahl N der Motoneurone sowie Fazialiskernvolumen V_{VII} pro Motoneuron MN im Fazialiskerngebiet (J. Kiesler)	S. 45
Abb. 5.6	Analyse der Motoneuronenfläche A und cholinерger (ChAT ⁺) Synapsen (J. Kiesler)	S. 47
Abb. 5.7	Analyse der Amplitude der Vibrissenbewegung (J. Kiesler)	S. 49
Abb. 5.8	Korrelationsanalyse der funktionellen und histologischen Ergebnisse (J. Kiesler)	S. 51

9. Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Labor für Neurowissenschaften der Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Universitätsklinikum Jena, welches unter der Leitung von Professor Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius steht.

Mein Betreuer und direkter Ansprechpartner, dem mein besonderer Dank gilt, war PD Dr. med. Irintchev. Er stand mir bei der wissenschaftlichen Erarbeitung des Themas stets unterstützend und hilfsbereit zur Seite. Bei fachlichen und methodischen Fragen konnte ich mich jederzeit an Dr. Irintchev wenden.

Zudem gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Mira Finkensieper, Fachärztin an der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universität Jena. Die Arbeit ist Teil eines von ihr beantragten IZKF-Nachwuchsförderungsprojekts. Desweiteren möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir ihre Daten der videobasierten Bewegungsanalyse der Vibrissen zu Verfügung gestellt hat.

Ebenso gilt mein Dank der medizinisch-technischen Assistentin Heike Thieme, die die experimentellen und organisatorischen Aufgaben im Labor durchführte und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Auch aus meinem privaten Umfeld erhielt ich viel Unterstützung und Zuspruch. So möchte ich nicht zuletzt noch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich immer wieder motiviert haben.

10. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Judit Kiesler
Adresse:	Zillerstraße 2, 04317 Leipzig
Telefon:	0157/73525327
E-Mail-Adresse:	judit.kiesler@gmx.de
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	17.04.1988
Geburtsort:	Leipzig

Schulische Ausbildung

09/1994 – 02/1998	Staatliche Grundschule Gotha-Siebleben
03/1998 – 07/1998	Moritzschule, Erfurt
09/1998 – 07/2002	Martin-Luther-Gymnasium, Erfurt
09/2002 – 06/2006	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Erfurt (Abschluss: Abitur)

Studium

10/2006	Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Herbst 2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Herbst 2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Zeugnis über die Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote befriedigend
	Approbation

01/2013 – 11/2013

Promotion
Prof. Dr. med. O. Guntinas-Lichius,
PD Dr. med. Andrey Irintchev
Universitäts-HNO-Klinik Jena
Thema: Einflüsse einer kombinierten Läsion des
somatosensorischen Kortex und des Nervus facialis auf
die strukturelle Gehirnplastizität und die funktionelle
Erholung der Vibrissenmuskulatur bei der Ratte

Beruflicher Werdegang

seit September 2013

Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und Intensivtherapie,
Universitätsklinikum Leipzig
Direktor: Prof. Udo X. Kaisers

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend)
Spanisch (Grundkenntnisse)

EDV-Kenntnisse

Word
PowerPoint
Excel
Adobe Photoshop

Interessen

Literatur, Theater
Reisen
Sport (Inlineskaten, Schwimmen, Laufen)

Mitgliedschaften

Festival de Colores e.V.

Leipzig, den 16.12.2013

11.Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. O. Guntinas-Lichius, PD Dr. med. A. Irintchev, Dr. Mira Finkensieper, Heike Thieme (MTA), die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.